

Tesis Doctoral
Universidad Autónoma de Madrid



Materiales basados en óxidos de titanio
destinados a implantes para reparación de
lesiones del Sistema Nervioso Central

María Canillas Pérez

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Directoras

Dra. Eva Chinarro Martín

Dra. Berta Moreno Burriel



CSIC

Instituto de Cerámica y Vidrio (CSIC)

A mis padres, Paloma y Vicente

A mi hermana, Vicky.

Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro.

Santiago Ramón y Cajal

Premio Nobel en Fisiología y Medicina en el año 1906, por la Doctrina de la Neurona

INDICE

Abstract	1
Starting Point and Objectives	5
I. Introducción	13
1.1 ¿Qué es un biomaterial?	13
1.2 Evolución de los biomateriales.....	14
1.3 Clasificación de biomateriales	18
1.3.1 Biomateriales cerámicos	20
1.4 Biomateriales en la reparación del tejido del Sistema Nervioso Central: Lesiones de médula espinal	21
1.4.1 Materiales de conexión tridimensionales: conductos (<i>Conduits</i>) y andamiajes (<i>Scaffolds</i>)	23
1.4.2 Estimulación eléctrica en reparación del tejido nervioso	25
1.4.2.1 Electrodo en biomedicina	27
1.5 Implantes, proceso inflamatorio y encapsulamiento	30
1.6 El TiO_2	33
1.6.1 Aplicaciones del TiO_2 como biomaterial	36
1.7 Fases de la serie de Magnéli Ti_4O_7 y Ti_5O_9	37
Bibliografía.....	41
II. Métodos de síntesis procesamiento y caracterización de materiales	49
2.1 Síntesis	49
2.1.1 Método sol-gel y posterior precipitación.....	50
2.1.2 Método de combustión	50
2.2 Tratamientos térmicos para la síntesis y conformado de los materiales.....	51
2.2.1 Calcinación	51
2.2.2 Conformado de polvos calcinados.....	52
2.2.1.1 Conformado de polvos calcinados para la fabricación de discos densos	53
2.2.2.2 Conformado de polvos calcinados para la fabricación de estructuras tridimensionales	54
2.2.3 Sinterización	54

2.2.4 Tratamientos térmicos en atmósfera controlada para la preparación de materiales basados en titanio con conductividad eléctrica.....	55
2.2.4.1 Reducción: Obtención de fases de Magnéli Ti_4O_7 y Ti_5O_9	55
2.2.4.2 Nitruración: Obtención de TiN	55
2.3 Caracterización de muestras	56
2.3.1 Medida de la distribución de tamaño de partícula.....	57
2.3.2 Superficie específica (isoterma de BET)	57
2.3.3 Análisis térmico diferencial i termogravimétrico (ATD-TG)	58
2.3.4 Análisis químico de nitrógeno	59
2.3.5 Difracción de rayos X (DRX).....	59
2.3.6 Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDXRF)	61
2.3.7 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	62
2.3.8 Medidas de absorbancia de luz ultravioleta-visible (UV-Vis). Medidas de <i>Band Gap</i>	63
2.3.9 Microscopía por luz de contraste para medidas de ángulo de contacto	65
2.3.10 Microscopía óptica	65
2.3.11 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	66
2.3.12 Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)	66
2.2.13 Espectroscopía de microRaman acoplada a microscopio óptico Confocal	67
2.4 Estudio de la actividad neutralizadora de radicales	68
2.4.1 Ensayos SIN-1	68
2.4.2 Ensayos DPPH·	70
2.5 Estudio eléctrico y electroquímico de electrodos Ti_4O_7 , Ti_5O_9 y TiN	72
2.5.1 Medida de la conductividad en corriente continua por el método de las cuatro puntas.....	72
2.5.2 Medidas eléctricas en corriente alterna. Espectroscopía de Impedancia Compleja (EIC)	73
2.5.3 Voltametría cíclica.....	74
2.5.3.1 Evaluación de la estabilidad electroquímica en medio fisiológico de Ti_4O_7 , Ti_5O_9 y TiN	75
2.5.3.2 Estudio electroquímico del mecanismo de neutralización de especies radicales por parte de Ti_4O_7 y Ti_5O_9	76
2.5.4 Ruido electroquímico	78

2.6 Aplicación de campo eléctrico (<i>electric field</i> , EF) en corriente continua (<i>direct current</i> , DC) sobre cultivos celulares	79
2.6.1 Cultivos celulares	80
2.6.2 Aplicación de EF	81
2.6.3 Obtención de datos.....	83
2.6.3.1 Microscopio de contraste.....	83
2.6.3.2 Microscopio de fluorescencia	84
Bibliografía.....	85

III. Síntesis, procesamiento y caracterización de materiales basados en óxidos de titanio91

3.1 Introducción.....	91
3.2 Síntesis y procesamiento cerámico del TiO ₂	92
3.2.1 Obtención de polvos calcinados a diferentes temperaturas	94
3.2.2 Obtención de muestras densas de TiO ₂	95
3.2.3 Conformado y obtención de sustratos tridimensionales, <i>conduits</i> y <i>scaffolds</i> , de TiO ₂	96
3.2.4 Obtención de fases de Magnéli en polvos muestras densas y sustratos tridimensionales mediante procesamiento crómico a partir de TiO ₂	98
3.2.5 Obtención de TiN en polvos y muestras densas	101
3.3 Síntesis y procesamiento cerámico de CeO ₂	102
3.4 Caracterización de materiales de TiO ₂	103
3.4.1 Polvos <i>recién preparados</i> y calcinados de TiO ₂	103
3.4.2 Polvos comerciales de TiO ₂	110
3.4.3 Muestras densas en forma de discos de TiO ₂	114
2.4.3.1 Estudio para la elección del tratamiento térmico de sinterización	115
2.4.3.2 Estudio de la superficie de las muestras sinterizadas	122
3.4.1 Andamiajes 3D en forma de tubos, <i>conduits</i> , y esponjas, <i>scaffolds</i> , de TiO ₂	128
3.5 Caracterización de materiales de CeO ₂	130
3.5.1 Caracterización de polvos comerciales de CeO ₂ y <i>recién preparados</i> de CeO ₂ y (CeO ₂) _{0.98} (CaO) _{0.02}	130
3.4.2 Caracterización de discos densos de (CeO ₂) _{0.98} (CaO) _{0.02}	134

3.6 Conclusiones.....	136
Bibliografía.....	139
IV. Materiales para electrodo en biomedicina	143
4.1 Introducción.....	143
4.2 Síntesis y caracterización de materiales Ti_4O_7 y Ti_5O_9	147
4.2.1 Caracterización química	147
4.2.2 Caracterización morfológica y microestructural de las muestras reducidas.....	153
4.2.3 Caracterización eléctrica y electroquímica	159
4.2.4 Cultivos celulares	171
4.3 Síntesis y caracterización de TiN	173
4.3.1 Caracterización de TiO_2 nitrurados	175
4.3.1.1 Caracterización química.....	175
4.3.1.2 Caracterización eléctrica	177
4.3.2 Caracterización de TiN obtenido por nitruración de TiO_2 en NH_3 a $1100^\circ C/3h$	178
4.4 Conclusiones.....	187
Bibliografía.....	190
V. Estudio de la actividad neutralizadora de especies radicales	195
5.1 Introducción.....	195
5.2 Caracterización de las propiedades de los materiales en polvo que se relacionan con la actividad <i>scavenging</i>	198
5.3 Ensayos de evaluación de la actividad <i>scavenging</i>	203
5.3.1 Ensayos SIN-1	203
5.3.2 Ensayos DPPH·	210
5.4 Conclusiones.....	219
Bibliografía.....	221

VI. Estudio del de neutralización de radicales	225
6.1 Introducción	225
6.2 Caracterización de los materiales	227
6.2.1 Espectroscopía UV-Vis	227
6.2.2 DRX	228
6.2.1 Medidas del <i>Band Gap</i>	230
6.3 Estudio electroquímico	231
6.3.1 VC	231
6.3.2 ECN	235
6.4 Conclusiones.....	237
Bibliografía.....	238
 VII. Evaluation of electrical stimulation of neural growth in direct current by using electric field.....	241
7.1 Introducción	241
7.2 Assay preparation	246
7.2.1 Cell Culture	246
7.2.2 Electric Field Application	247
7.2.3 Data Collection and Analysis	249
7.2.3.1 Phase contrast microscope	249
7.2.3.2 Fluorescence microscope	250
7.3 Influence of the substratum in the Neuronal morphology	251
7.4 Field-induced asymmetry of the direction of neurite growth.....	255
7.4.1 Phase contrast microscope for cover glass substrates	257
7.4.2 Fluorescence microscope for TiO ₂ substrates	247
7.5 EFs applied by Ti ₄ O ₇ y Ti ₅ O ₉ electrodes.....	237
7.6 Conclusiones.....	237
Bibliografía.....	238
 VIII. Summary Conclusions	275

Abstract

The brain can be damaged by a wide range of conditions including infections, hypoxia, poisoning, stroke, chronic degenerative disease and acute trauma. Spinal cord trauma creates irreversible injuries which entail permanent disability. Worldwide, number of people affected with this kind of injuries is 2,000,000. To this number thousand of new cases are added every year.

Biomaterials are taking an even more important role for repair injuries and disorders of Central and Peripheral Nervous System (CNS and PNS). This work join to this way, studying and developing ceramic materials for a future implant whose aim is repair spinal cord injuries. Materials chosen for the implant have to solve two different functions: first one, substrate function, where neural cells adhere, survive and grow; second one, as electrode for electrical stimulation, directing the growth of axons and dendrites.

Inspired in the good biocompatibility properties of Titanium, thanks to the TiO_2 surface layer created during the pasivation process, was born the idea of suggest this material as substrate for the implant. One of the main objectives purpose in the development of spinal cord implants, is avoid the inflammatory reactions that it is a property seems to have this material. On the other hand, the excellent electrical and electrochemical properties of some non-stoichiometric Magnéli phases, like Ti_4O_7 and Ti_5O_9 , make these materials were proposed as electrodes for electrical stimulation. They have been used as electrodes before but have never been focused on medicine. Other proposal, of this work, as electrode material is ceramic TiN obtained by nitridation of the TiO_2 synthesised previously. The fact to purpose these materials follows the objective of decrease the inflammatory response, which could cause the insulation of the surface electrode.

TiO_2 has been synthesised and processed by ceramics methods as powders and 2-D dense samples (pellets) for the study of chemical and physical properties of the material. These have been related with the scavenging activity and neural cells behaviour cultured over the surfaces of the dense samples. Cells cultures, carried out

over the material with neural cells from cerebral cortex of E14 Wistar rat embryos and spinal cord of *Xenopus* embryos, showed excellent results. Cells adhere, survive and grow developing a good number of neurites and axons around the cell body, axons which own numerous filopodia and branches and healthy growth cones. This behaviour is associated with the suitable hydrophobicity and the roughness topography of the surface. The surface is formed by grains in the order of microns which presented roughness with hill shape in the top surface and terraces close to the grain border sides. Both topography formations are in the order of nanometres and cells are sensitive to this topography size.

Ceramic process was developed to obtain TiO_2 3-D structures as tubes, commonly named *Conduits*, and sponges, commonly named *Scaffolds*. They present appropriate pores dimensions, for a future implant, which allow the colonization of the implants by cells and the vascularisation of physiological media and nutrients. Moreover, they show similar topography to the 2-D dense samples, where cell cultures were studied, with terraces formation next to the grain boundary.

On one hand, Ti_5O_9 , Ti_4O_7 / Ti_5O_9 mixture phases and Ti_4O_7 were synthesised by thermal treatment in reduced atmosphere from the TiO_2 materials in the different conformations. Electrical and electrochemical studies reveal promising information. The electrical conductivity measured is considerably higher to the results found in the literature. On the other hand, the stability of the material is studied by cyclic voltammetry using, as electrolytes, solutions which simulate physiological medium. The electrodes get work in wide windows of potential where redox reactions signals are not found. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy were employed to study the charge injection mechanism utilised by the material for inject charge to the medium or tissue, from the surface of the electrode. Results show a capacitive mechanism which avoids redox reactions between the electrode surface and the medium. The charge storage capacity (CSC) was calculated obtaining higher values than found it in the literature. The CSC seems play an important role in the right working order of the electrode and the higher is the CSC value the better is the result of the stimulation. The charge injection mechanism and the CSC were studied for TiN too. In this case, results point to a capacitive mechanism to inject charge too. Again, the CSC is higher compare with electrodes studied in the literature.

The inflammatory response is triggered by the reactive species of nitrogen and oxygen (RNS and ROS) released when inflammatory cells detect a foreign body. The biocompatibility of a material implanted is related with its capacity to neutralize these reactive species. This neutralizer capacity, in titanium oxide materials, TiO_2 and Magnéli phases, was evaluated by the study of the scavenging activity of reactive species. The scavenging activity was studied by two different methods whose protocols were based on the literature. First method uses a peroxynitrite radical ($\text{ONOO}\cdot$) in a medium which simulates physiological conditions. Second method employs the semi-stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical ($\text{DPPH}\cdot$). In every case, materials neutralize the reactive species. Furthermore, the scavenging activity of other titanium oxide materials was evaluated and compared among them, according with the chemical and physical properties studies for each one. In that way, properties of the materials, which depend on the ceramic process (the rutile and anatase proportions, the particle size distribution, the specific surface area and the oxidation state of Titanium), are related with the scavenging mechanism. The scavenging activity is increased when a high composition in rutile phase, low *Band Gaps*, and reduced oxidation states are present; and these properties stay related between themselves. This work was carried out in the Instituto de Engenharia Biomedica in the University of Porto, Portugal, during a stay under the supervision of Dr. Ana Paula Pêgo.

Proved the scavenging activity of Magnéli phases, Ti_5O_9 and Ti_5O_9 , and their good properties as electrode, electrochemical methods were proposed for the study of the scavenging mechanism. In these experiments the working electrodes were the Magnéli phases obtained from TiO_2 reduction. The electrolyte, where the assays were carried out, was a solution of $\text{DPPH}\cdot$. With this aim two different methods were suggested: cyclic voltammetry and electrochemical noise. In case of cyclic voltammetry exists a wide literature about the use of this method in the study of antioxidants compounds, reactive species activity and scavengers. This literature includes different electrochemical studies about $\text{DPPH}\cdot$. However, about electrochemical noise, which is commonly uses in corrosion studies, it was not found any work about its use in biological redox systems. Both methods reinforce the results obtained with other techniques about this material are capable to induce the reduction of $\text{DPPH}\cdot$, towards his reduced form DPPH_2 ; and without changes in the surface of the material corroborated by X ray diffraction and *Band Gap* measurements.

Finally, electrical stimulation in direct current (DC) was tested with the materials suggested for the future implant. This work was carried out during two stays in the Institute of Medical Sciences in the University of Aberdeen, Scotland, under the supervision of Dr. Ann Rajniecek. TiO_2 was tested as substrate of *Xenopus* neural cells under electrical stimulation conditions and Magnéli phases as electrodes for stimulate right placed in contact with cell culture media. Results are compared with control, based on the assays, with a protocol already right stipulated and published in the literature, where cover glass is used as control and Ag/AgCl electrodes are connected with the cell culture media through Agar bridges. Cell cultures over TiO_2 substrate, when electric field (EF) is applied, show lower number of cells, lower number of branches in the axons and lower number of filopodia in the axons and growth cones but higher than obtained in cell cultures over other substrates used as control. In any way, axons of cells get turn on towards cathode by electrostimulation. When EF is applied by Magnéli phases on cell cultures over cover glass is necessary work with low values of EF to avoid the damage of the cells compared with EF used with Ag/AgCl electrodes. This result suggests a future work improving the surface electrode properties, by playing with ceramic process, with the aim of can use higher working potentials. However, is important emphasize that a new step have been gotten when electrodes get work straight placed on the cell culture.

Starting point and objectives

Traumatic Spinal Cord Injuries (SCI) are dramatic irreversible events that can incapacitate victims for life [1], neurons die or their axons are disrupted, interrupting the transmission of information. In adult mammals, CNS damage triggers a complex set of events ending in tissue healing without restoration of normal function. Most efforts to promote CNS repair have concentrated on stimulating axon regeneration by means of cell transplants, neurotrophic factors, and enzymes or antibodies that neutralize neurite growth inhibitors [2]. Actually, biomaterials are playing an important role in repair injuries of central nervous system (CNS), whose objectives are directed in the way of delivery-drug and scaffolds [3]. Moreover the emerging neural prostheses and therapies for central and peripheral nervous system are based on electrical stimulation [4].

Inspired in these ideas was born the European Project *Development of a Bioelectrochemical Device for CNS Repair*, NERBIOS, where this doctoral thesis is involved. It is the first part of ambitious longer term project which is focused in the development of materials for made an implant used for repair injuries in the Central Nervous System tissue.

This project is aimed at designing a material to provide support and guidance cues for neuron growth and can be processed as 3D-scaffold with pores of defined geometry and orientation. EF stimulation by DC will be used to induce and guide the growth of axons. Other purpose is the use of electroactive materials. If good biocompatibility of such materials is achieved and maintained under electrical stimulation, it would constitute a powerful system for controlling cell behaviour *in vivo*. This approach demands the use of materials with electrical properties that remain stable in aqueous medium for months to years, the period necessary to repair human CNS lesions. Consequently, to this thesis work non-degradable materials were chosen.

However, factors related to material biocompatibility [5] and the balance efficacy/safety of charge transfer at the electrode/tissue interface [6] limit the use of implanted electrodes. These problems also have to be considered in the design of an implantable device for the electrochemical promotion of neural repair. First, implanted

materials evoke a foreign-body response [7], which in some cases leads to chronic inflammation demanding implant removal. Second, electrical stimulation can contribute to cell death as a consequence of the production of cytotoxic molecules (e.g. oxygen radicals under cathodic and anodic reactions [6, 8]. Furthermore, organic encapsulation of the electrode enhances the impedance of the system demanding an increase of current injection to be effective [9], increasing also the risk of tissue damage. Implant integration and invasion by host blood vessels would counteract this problem in the medium term.

In summary, this thesis work aim to develop a 3D scaffold made of non-degradable or hybrid electroactive materials to be implanted into the CNS. The electrochemical properties of those materials will avoid undesirable cellular responses, such as persistent macrophage activation, and will permit the application of EFs to promote lesion repair and the measurement of cell responses. Respect that, this work is focused on titanium oxides. These materials are used to make discs for cell culture and porous 3D scaffolds for brain and spinal cord repair. Their electrochemical and structural properties will be varied in oxidation state, electrical conductivity, particle size, porous size, to study how these factors influence cellular responses. This information will allow optimisation of the electrochemical and structural profile of the materials, in order to reduce inflammatory responses while improving neural cell growth and survival.

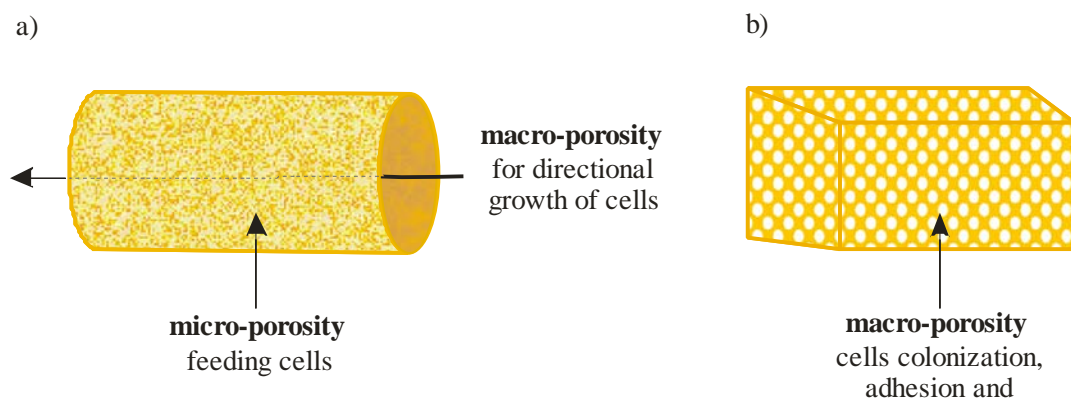


Fig. 2.1 3-D structure of ceramic material with corresponding micro and macro-porosities a) tubular shape, *conduit* and b) sponge shape, *scaffold*.

Materials from two different natures are proposed as substrates in the implant for the whole project: polymeric and ceramic; A hybrid polymeric-ceramic material is proposed for a second term. As it has been commented, this thesis work is focused in ceramic material, regarding to the geometry of the substrates two different 3D structures was proposed; a tubular shape structure, *conduit*, with a micro-porosity cross the substrate, which allows the arrival of nutrients inside of the structure, and a macro-porosity parallel to the axis of the tube for the directional growth of the cells (**Fig. 2.1 a**). On the other hand, a sponge shape structure, *scaffold* with a macro-porosity which allows the colonization and growth of the cells cross to the 3D structure (**Fig. 2.2 b**). But the whole characterisation were realized over pellets because of the difficulty to characterise on the 3D structures. Furthermore, EF in DC is proposed for stimulate the growth of cells and oriented axons and dendrites in the direction of the EF.

In this doctoral thesis three different ceramic materials are proposed for two different applications approach to the final implant. In the first place, TiO_2 is proposed as substrate where the neural cells adhere, survive and growth [10-12]. TiO_2 is proposed because of his biocompatibility and electrochemical properties. Electrochemical properties of TiO_2 makes it a suitable material for be used in biomedical implant where electrical stimulation pretends to be applied [10]. On the other hand, Magnéli phases, Ti_4O_7 and Ti_5O_9 , and TiN are proposed as electrodes for the electrical stimulation. Magnéli phases, Ti_4O_7 and Ti_5O_9 , show a high electrical conductivity and high corrosion resistance in hard redox conditions. These properties are significant to suggest these materials as electrodes [13]. TiN has been proposed as electrode in biomedical applications. TiN is a metallic conductor, chemically stable and show a good biocompatibility [4].

According with these proposals the specific objectives of the doctoral thesis work are divided in next objectives:

- ❖ Synthesis and ceramic processing:
 - ✓ Synthesis and ceramic processing of TiO_2 . TiO_2 will be synthesized as high specific surface area powders and processed for obtain dense disks, and 3D structures, tubes and *scaffolds*.
 - ✓ Obtain Ti_4O_7 and Ti_5O_9 from TiO_2 samples. Ti_4O_7 and Ti_5O_9 in powders, dense disks and 3D structures from TiO_2 samples by thermal treatment in N_2/H_2 atmosphere.
 - ✓ Preparation of TiN from TiO_2 samples. TiN powders and dense disks are obtained by nitridation of TiO_2 samples.
- ❖ Physic-chemical Characterization of materials using different techniques, for trying to establish the correlation between these characteristics, which can be modified during the synthesis, and the properties of the materials.
- ❖ Study the biocompatibility of the materials by the evaluation of the scavenging activity, by SIN-1 and DPPH· assays. Study of the parameters involved in the scavenging mechanism.
- ❖ Electrical and electrochemical studies of Ti_4O_7 and Ti_5O_9 as electrodes to determine their suitability to be used as electrodes in electrical stimulation
- ❖ Electrochemical study of scavenging mechanism by cyclic voltammetry and electrochemical noise using Ti_4O_7 and Ti_5O_9 as electrode and DPPH· as medium.
- ❖ Evaluation of TiO_2 as substrate of neural cell cultures of *Xenopus* when EF in DC is applied and not applied. Evaluation of Ti_4O_7 and Ti_5O_9 as electrodes for applied EF in DC in neural cell cultures of *Xenopus*.

Bibliography

1. Perale, G., F. Rossi, E. Sundstrom, S. Bacchiega, M. Masi, G. Forloni and P. Veglianese, *Hydrogels in spinal cord injury repair strategies*. ACS Chemical Neuroscience, 2011. **2**(7): p. 336-345.
2. Kordower, T.a., *CNS Regeneration, Basic Science and Clinical Advances*. Academic Press, San Diego, 1999.
3. Orive, G., E. Anitua, J.L. Pedraz and D.F. Emerich, *Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration*. Nature Reviews Neuroscience, 2009. **10**(9): p. 682-692.
4. Cogan, S.F., *Neural stimulation and recording electrodes*. 2008. p. 275-309.
5. Moss, J., T. Ryder, T. Aziz, M. Graeber and P. Bain, *Brain*. 2004. **127**: p. 2755–2763.
6. Merrill, D.R., M. Bikson and J.G.R. Jefferys, *Electrical stimulation of excitable tissue: Design of efficacious and safe protocols*. Journal of Neuroscience Methods, 2005. **141**(2): p. 171-198.
7. Anderson, J. and A.H. BD Ratner, FJ Schoen and JE Lemons (Eds), *Chapter 3: Host reactions to biomaterials and their evaluation*. Biomaterials Science. Academic Press, San Diego, 1996: p. 165–173.
8. Brummer, S.B. and M.J. Turner, *Electrical stimulation of the nervous system: The principle of safe charge injection with noble metal electrodes*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1975. **2**(1): p. 13-25.
9. Grill, W.M. and J.T. Mortimer, *Electrical properties of implant encapsulation tissue*. Annals of Biomedical Engineering, 1994. **22**(1): p. 23-33.
10. Berta Moreno, M.C., J.R.Jurado, E. Chinarro, *Una revisión del uso de TiO₂ en terapias e ingeniería tisular*. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2009. **48** (6): p. 321-328.
11. Collazos-Castro, J.E., A.M. Cruz, M. Carballo-Vila, M. Lira-Cantú, L. Abad, Á.P. del Pino, J. Fraxedas, A. San Juan, C. Fonseca, A.P. Pêgo and N. Casañ-Pastor, *Neural cell growth on TiO₂ anatase nanostructured surfaces*. Thin Solid Films, 2009. **518**(1): p. 160-170.
12. Carballo-Vila, M., B. Moreno-Burriel, E. Chinarro, J.R. Jurado, N. Casañ-Pastor and J.E. Collazos-Castro, *Titanium oxide as substrate for neural cell growth*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2009. **90**(1): p. 94-105.
13. Hayfield, P.C.S., *Development of a New Material Monolithic Ti₄O₇ EBONEX® Ceramic*. Royal Society of Chemistry, 2002 **Chapter 2**: p. 9-46.

Capítulo I

I Introducción

1.1 ¿Qué es un biomaterial?

La definición de *biomaterial* según el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española es: “material tolerado por el organismo, usado para implantes y otros fines”. Algunos autores definen los biomateriales de manera más tradicional en base a sus aplicaciones, cómo: “materiales usados en desarrollos médicos” [1]. Pero tal vez, una definición más exacta y a día de hoy más frecuentemente usada en el ámbito de los biomateriales sería: “material diseñado, fabricado o modificado por el hombre, puesto en contacto con un sistema biológico para evaluar, tratar, aumentar o remplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” [2, 3]. Quizá la dificultad de llegar a un consenso en la definición de *biomaterial*, se haya debido al amplio rango de materiales propuestos, a las numerosas y novedosas aplicaciones que se han abierto y a la rápida e importante evolución que han experimentado gracias a la investigación, sobre todo en las últimas décadas. Esta gran revolución que ha tenido lugar en el campo de los biomateriales se debe, a la interacción de dos disciplinas muy distintas del ámbito científico, la ciencia de los materiales y la ingeniería tisular, y a que han centrado sus esfuerzos en colaborar exitosamente para desarrollar una nueva área de trabajo [1].

1.2 Evolución de los biomateriales

El hombre ha hecho uso los biomateriales ya desde la antigüedad y pruebas de ello han llegado hasta nuestros días. En unas excavaciones realizadas al oeste de Tebas, Egipto, fue hallada una prótesis de madera que se encontraba remplazando el dedo pulgar en el pie de un ser humano momificado. Dicha prótesis ha sido datada entre 1065-740 a.C. y actualmente se encuentra en el museo del Cairo (**Fig. 1.1**). Dicha figura muestra un claro ejemplo de cómo el hombre, en el pasado, hacía uso de los materiales naturales que le rodeaban y los ajustaba a sus necesidades.



Fig. 1.1 Prótesis de madera adaptada para la función de remplazar el pulgar amputado. La pieza esta datada en 1065–740 a.C. y fue hallada en unas excavaciones arqueológicas en una tumba al oeste de Tebas, Egipto. [1].

El estudio científico, junto con unos cuantos accidentes fortuitos permitió, hace unos años, la unión de la química de los materiales con las ciencias biológicas. De esta unión surgió una ingeniería biológica sobre materiales inertes que abrió las puertas a una nueva disciplina, nacida a mediados del siglo pasado con nombre propio: *Ciencia de los Biomateriales* [4]. Así, desde principios del s. XX los biomateriales naturales empezaron a ser sustituidos por otros sintéticos como polímeros, cerámicas, metales y aleaciones metálicas [1].

A partir de aquí, el estudio de los biomateriales ha tomado muchos y diferentes caminos gracias a nuevas ideas, a veces surgidas de su interacción con el desarrollo de otras tecnologías y ciencias. Un impulso importante ha sido el descubrimiento de la nanotecnología, que ha contribuido al desarrollo de biomateriales mucho más sofisticados, tanto en su proceso de fabricación como en sus propiedades, tratando de imitar las características fisicoquímicas de los materiales naturales. Un ejemplo de esto es la tecnología para la obtención de biomateriales denominados de auto-ensamblaje. Esta tecnología trata de reproducir la manera en la que los materiales naturales se conforman desde escalas nanométricas, hasta alcanzar complejas estructuras tridimensionales que, sin embargo, no requieren más que una energía mínima para su proceso de formación [1], por ejemplo, proteínas y ADN o ARN. Este tipo de biomateriales, que se forman por auto-ensamblaje, además permiten ser introducidos en el cuerpo mediante vías denominadas no invasivas, de manera, que una vez introducidos o inyectados en el organismo en estado líquido puedan formar las estructuras tridimensionales deseadas por interacción con el medio extracelular [5-8]. Por otro lado, la ingeniería más tradicional de los materiales los sintetiza a escalas de milímetros o superiores para posteriormente rebajar su escala a nanómetros necesitando para ello una energía extra. Sin embargo, las nuevas necesidades de diseño y aplicación en este área mencionadas anteriormente, ha llegado también al campo de la ciencia y tecnología de materiales, y ha dado lugar al desarrollo de nuevos métodos de síntesis, como la síntesis por combustión o sol-gel, que permiten obtener materiales directamente en escala nanométrica [9].

Otros de los aspectos fundamentales que ocupan el estudio de la *Ciencia de los Biomateriales* son la interacción célula-material, y la interacción entre el biomaterial y medio extracelular. Basándose en el papel que juega el entorno de la célula en el proceso de migración celular, proliferación, especialización y formación de tejidos [10], se ha desarrollado una ingeniería de superficie de biomateriales [1]; ya que la primera y más importante interacción que tiene lugar durante la implantación de un biomaterial, es la que se establece entre su superficie y el entorno fisiológico. Un ejemplo en este sentido es el empleo de proteínas de amarre para facilitar la adhesión de las células a la superficie del substrato, actuando con nexo de unión [11, 12]. La mayor parte de las células, entorno al

90%, adquieren una carga parcialmente negativa a pH fisiológico, dándose una fuerte atracción electrostática entre ellas y la superficie de los sustratos con carga parcialmente positiva, gracias a las proteínas o péptidos depositados sobre ella [13]. La composición y la conformación que las proteínas adquieren al ser adsorbidas juega también un papel muy importante en la adhesión entre célula y sustrato [14]. Algunos ejemplos son, el colágeno, fibrinógeno, laminina o la polilisina, que son proteínas y polipéptidos muy conocidos para el uso de adhesión de células en cultivos celulares. Algunos materiales intentan imitar la naturaleza del medio donde se implantan, mediante la iniciación y regulación de la formación de estructuras bioactivas inorgánicas, de manera que se integren en tejidos minerales, como el óseo, dirigidas a aplicaciones dentales y ortopédicas [15, 16]. Otros casos de materiales bioinspirados son los adhesivos sintéticos nacidos también de la observación e intento de imitar la naturaleza, son por ejemplo, cómo se adhieren las extremidades de las lagartijas a las superficies mediante fuerzas de Van Der Waals, o las proteínas con alto contenido en aminoácido catecólico (DOPA) segregadas por lo mejillones para adherirse a la roca. Estos adhesivos pretenden ser usados en medios húmedos y secos y están dirigidos a aplicaciones médicas e industriales [1].

Las nuevas tendencias en la *Ciencia de los Biomateriales*, se han enfocado a desarrollar una tecnología que permita a los dichos materiales actuar a distancia. Es decir, al desarrollo de biomateriales capaces de dirigir el comportamiento de las células con que son implantados o células de los tejidos sobre los que se implantan, pero, ¿podrían los biomateriales actuar sobre células que se encuentran de forma remota?, y en tal caso, ¿cómo? Es sabido que nanopartículas de distintos materiales pueden ser “marcadas” para reconocer grupos celulares o tejidos [1]. De esta idea surgen los biomateriales dirigidos al transporte y, en algunos casos, posterior liberación de fármacos. Con este objetivo, el material actúa como un vehículo, llega hasta el tipo celular que corresponde donde libera la sustancia contenida sin afectar a otros tejidos o células que no interesa que la absorban [17, 18]. Aprovechando las diferencias que presentan las células tumorales de las sanas, esta técnica es una idea prometedora para el tratamiento del cáncer, puesto que se puede hacer llegar hasta las células tumorales [18-20] de manera exclusiva, los fármacos necesarios para

su tratamiento, sin que las células sanas queden afectadas. También pueden ser usados en la migración de células madre trasplantadas como vehículo transportador [21].

El estudio y comprensión de las propiedades de los biomateriales ha sido abordado generalmente desde el ámbito de las ciencias químicas. Pero, a medida que la investigación en este campo ha ido progresando, se ha demostrado que la interacción célula-material no sólo depende de las propiedades químicas de la superficie, sino que otras características han tomando gran importancia, tanto en su estudio como en sus posibles aplicaciones, entre las que se pueden destacar las propiedades topológicas, mecánicas y eléctricas. El hecho de que existan materiales naturales capaces de sentir señales, transmitirlos y responder a ellas ha abierto otro nuevo camino en la tecnología de los biomateriales [1]. Un ejemplo muy interesante de esto es un material que responde ante estímulos magnéticos, aplicado en la liberación de fármacos, permite controlar dicha liberación mediante señales de campos electromagnéticos [22]. Otro importante campo de estudio, también aquí englobado, son los materiales capaces no sólo de recibir señales sino de crearlas también y que poseen propiedades adecuadas para ser usados como electrodos [23]. Estos materiales están principalmente encaminados hacia regeneración tisular mediante estimulación eléctrica y electromagnética. A este tema se le dedica una especial atención más adelante, en el capítulo IV, de Materiales para electrodo en biomedicina. También pueden estar destinados a suplir una función como es el caso de los marcapasos.

Algunos biomateriales son capaces de responder ante el medio biológico que los rodea. Son los denominados biomateriales inteligentes, que, ante estímulos biológicos como cambios de pH, temperatura o luz cambian sus propiedades químicas o físicas. Esta propiedad les hace ser propuestos como sensores y pueden ser usados como sistemas de control para la liberación de fármacos, la adhesión celular o la permeabilidad [4].

Los biomateriales nos sólo están dirigidos al uso directo en medicina sino también a desarrollo en ciencias biológicas. Para diagnóstico, por ejemplo, se trabaja en el desarrollo de materiales más rápidos en dar señal de respuesta y más económicos, como pueden ser los test de embarazo, de drogas y contaminantes [24]. Además, se desarrollan substratos

para cultivos celulares *in vitro* más sofisticados, tanto bidimensionales como tridimensionales [10].

La importancia que la *Ciencia de los Biomateriales* tiene en nuestros días se ve reflejada en el aumento en publicaciones de carácter científico relativas a biomateriales, el incremento del número de departamentos de investigación que dirigen sus esfuerzos al estudio y desarrollo de tecnología en esta disciplina y, además, cada vez mayor número de universidades que ofertan estudios en la materia ante la mayor demanda de futuros alumnos [1]. Pero sin duda alguna, el punto más importante para que la investigación sobre una materia tenga futuro, es que la tecnología derivada de ella se inserte en el mercado y produzca beneficios económicos. La *Ciencia de los Biomateriales* interactúa con distintas disciplinas como ciencia de los materiales, ingeniería tisular, biología, química, medicina y es por ello que tantas compañías se dedican a investigar sobre el tema invirtiendo en ello importantes cantidades de dinero [25]. El mercado de los biomateriales, que incluye diferentes aplicaciones en medicina, odontología, liberación controlada de fármacos y análisis *in vitro*, mueve sólo en Estados Unidos 200 billones de \$ al año (datos del año 2007) [1].

1.3 Clasificación de biomateriales

Teniendo en cuenta los primeros materiales sintéticos y más convencionales que se han usado con fines médicos se pueden dividir en tres grandes grupos: metálicos, donde se incluyen metales y aleaciones; cerámicos, que agrupan también a los vidrios, vitrocerámicos y carbones; y, por último, los polímeros, donde se encuentran incluidos termoplásticos, elastómeros y textiles [1].

Pero como ya se ha comentado los biomateriales han sufrido una evolución muy rápida en muy poco tiempo, en base a esta evolución los materiales han sido recientemente divididos en cuatro generaciones de biomateriales[26]:

La primera se compone por materiales estándar como aceros, metales y polímeros, que en un primer momento, fueron hechos para otras aplicaciones pero posteriormente se usaron en medicina y fueron adaptados para ello [2].

En segundo lugar, tenemos la generación de los titanios y sus aleaciones, que fueron desarrollados a mediados del siglo pasado con fines médicos, y que junto con los polímeros termoplásticos dominan hoy en día el mercado de los biomateriales. Esta generación de biomateriales trataba principalmente de lograr un efecto fundamental en la implantación, que era el evitar el rechazo por parte del cuerpo en que son implantados. Para ello, se hacía uso de materiales supuestamente inertes, es decir, que no interaccionaban con el medio que en que se implantaban, evitando reacciones que perjudicasen al huésped y por lo tanto que promovieran el rechazo del implante [2].

Sin embargo, en la pasada década de los noventa, llegó la tercera generación de los biomateriales, los bioactivos, así denominados, puesto que son capaces de interaccionar con el tejido vivo ya que, generalmente, presentan características y composiciones similares a los tejidos naturales. Aquí se encuentran materiales como la Hidroxiapatita, la Wollastonita y los biovidrios [15, 16] dirigidos a la reparación del tejido óseo.

Por último, la cuarta generación, es aquella a la cual pertenecen los denominados materiales inteligentes, debido a que son capaces de cambiar sus propiedades ante un estímulo biológico. De esta manera pretenden ser aplicados como sensores para monitorizar una función e interaccionar con el sistema biológico. Los materiales de esta etapa aún están en fase de desarrollo y todavía no se han utilizado clínicamente.

1.3.1 Biomateriales cerámicos

Las cerámicas empezaron a tener interés en el mundo de los biomateriales a finales de la década de los 60'. Se introdujeron como alternativa a los implantes metálicos gracias a su inercia química y biocompatibilidad [27], aunque también en base a sus interesantes propiedades mecánicas, como una elevada dureza, mejoradas gracias a la investigación desarrollada desde entonces. Por otro lado, estos materiales se caracterizan por una inercia química, la cual, es muy importante para evitar reacciones no deseadas evitando, así, el rechazo del implante [2].

Las biocerámicas han sufrido un desarrollo con respecto a sus propiedades químicas según la respuesta del tejido ante dichas propiedades. Se pueden dividir en tres grupos. En el primero están las **cerámicas bioinertes**, las cuales, no reaccionan apenas con el medio; dentro de este grupo se encuentran la Alúmina (Al_2O_3), la Zircona (ZrO_2), composites obtenidos mediante la mezcla de ambos compuestos y el carbón. Existen otras cerámicas que pertenecen ya a la tercera generación de biomateriales citada anteriormente y que engloban el segundo grupo de esta clasificación, son las **cerámicas bioactivas**. Dichos materiales reaccionan en contacto con el medio para dar lugar a una interfase química mineral que une material y tejido. La composición química de dicha interfase se parece mucho a la composición mineral del tejido en que se implanta. En este grupo se encuentran materiales como la hidroxiapatita y la wollastonita [28], y junto a ellos también se encuentran materiales vidrios y vitrocerámicos como el Bioglass[®] [29].

El tercer grupo lo componen las **cerámicas bioreabsorbibles** [27]. Como su mismo nombre indica, son materiales que se reabsorben con el tiempo dejando paso al tejido natural. El problema de este tipo de cerámicas es la pérdida de sus propiedades mecánicas al disolverse. Dentro de este último grupo se encuentran el fosfato tricálcico (TCP) y el β -TCP [28].

1.4 Biomateriales en la reparación del tejido del sistema nervioso central:

Lesiones de médula espinal

Las lesiones que se pueden encontrar en el sistema nervioso pueden venir causadas por infecciones, hipoxia, envenenamiento, infarto cerebral, enfermedades degenerativas y/o traumas [30]. En este sentido, los biomateriales están tomando un papel cada vez más importante en el tratamiento de desordenes y lesiones del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP).

Los traumas en la médula espinal crean lesiones irreversibles y conllevan una incapacidad de por vida. Aproximadamente 2.000.000 de personas en el mundo, la mayor parte de ellas con edades inferiores a los 30 años, padecen de algún tipo de lesión en la médula espinal. Cada año se suman aproximadamente 13.000 casos [31]. La lesión puede venir provocada por una contusión, compresión o extensión. Dicha lesión, así como el proceso que la provocó, impiden la llegada de glucosa y oxígeno al tejido, fenómenos que dan paso a la llamada “segunda lesión”, donde se produce muerte celular de neuronas, daño de los axones y desmielinización. Además, tras el proceso traumático comienza el proceso inflamatorio con la correspondiente activación de las células gliales y la fibroblásticas [32]. Lesiones de pequeño impacto en el SNP cicatrizan mediante la formación de fibras de fibrina que cruzan la zona lesionada, permitiendo que las células de Schwann migren desde ambos extremos de la lesión orientando las bandas de unión tipo Bungner y estimulando el crecimiento de las neuritas. Se ha encontrado que las células neuronales son capaces de puentear brechas de un ancho inferior a 6 mm. [33, 34]. Sin embargo, en el SNC, el proceso es diferente; la cicatrización descontrolada que tiene lugar supone una barrera en sí para que los axones vuelvan de nuevo a crecer y células, como astrocitos, que acuden hasta la zona lesionada para construir la cicatriz, segregan moléculas que inhiben su crecimiento [35]. De esta manera, la formación de la cicatriz glial, que trata de ser un proceso auto-terapéutico desarrollado por nuestro organismo para la reparación del SNC, se convierte en una trampa para las células circundantes a la lesión.

Hasta la fecha los tratamientos que existen disponibles para la reparación de lesiones del SNC minimizan la lesión secundaria y tratan de reforzar mediante terapia la recuperación de funcionalidad de aquel paciente que tiene movilidad reducida. No obstante las investigaciones están dirigidas a dar un paso más, consiguiendo la regeneración del tejido y restaurando las funciones sensoriales y motoras [31].

Los principales objetivos perseguidos por los biomateriales en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso son tres; en primer lugar, la neuroprotección, reduciendo los procesos de inflamación, excitotoxicidad, apoptosis y la muerte celular secundaria. En segundo lugar, está el trasplante y la ingeniería tisular para remplazar el tejido dañado y proveerle de nutrientes. Y en tercer y último lugar, está la regeneración del propio tejido promoviendo el crecimiento axonal y de neuritas. Las soluciones planteadas, desde el punto de vista de los biomateriales, para cumplir con dichos objetivos, implican el impulso de dos diferentes estrategias enfocadas al desarrollo de materiales para liberación de fármacos y de andamiajes tridimensionales o *scaffolds* [30]. A estos últimos, se les dedica un subapartado específico, en el capítulo III, Síntesis, Procesamiento y Caracterización de materiales basados en óxidos de titanio, de esta memoria de tesis.

Los biomateriales aplicados en liberación de fármacos pueden ser a su vez subdivididos en dos tipos. En primer lugar, los que actúan como vehículos transportadores de diferentes sustancias, ya sean antiinflamatorias o factores de crecimiento, a través de la barrera sangre-tejido cerebral [30]. Esta barrera supone un gran obstáculo para los péptidos más pesados así como para la mayor parte de los compuestos de bajo peso molecular [36]. El material es diseñado para actuar como *Caballo de Troya* de dichas partículas, las cuales, son liberadas una vez se traspasa la barrera. Dentro de este grupo se encuentran los liposomas, nanopartículas poliméricas biodegradables y recientemente, se están probando nanopartículas cerámicas, micelas poliméricas y dendrímeros [1]. En segundo lugar, están los que actúan como sistemas de inmovilización celular [30], es decir, materiales que generan membranas semipermeables que proporcionan un encapsulamiento artificial con mayor biocompatibilidad, evitando así el encapsulamiento natural provocado por el proceso inflamatorio [37], por ejemplo, mediante la simulación del medio natural [38].

1.4.1 Materiales de conexión tridimensionales: conductos (*Conduits*) y andamiajes (*Scaffolds*).

Hasta ahora, los implantes propuestos para regeneración de tejido nervioso, se pueden dividir en dos grupos según su geometría: Materiales de conexión y andamiajes tridimensionales.

Los *materiales de conexión “conductos”* tienen forma tubular y tratan de unir los extremos opuestos de una zona de lesión con la intención de que el tejido vuelva a regenerar en esta parte hasta que ambas extremos vuelvan a conectar. Las propiedades que un buen *conduit* requiere son: que sea fino, poroso, flexible, biocompatible, biodegradable, adaptable, neuroinductivo, neuroconductor, con una superficie y propiedades mecánicas adecuadas. Una propiedad indispensable es la permeabilidad, que permita el paso de nutrientes al tejido durante el proceso de terapia [39, 40].

La investigación llevada a cabo para el desarrollo de arquitecturas tridimensionales pretende tipo andamiajes, *scaffolds*, al ser implantados en la zona de lesión actúen, a la par de soporte para las células circundantes a la lesión y de sustrato para el crecimiento celular, la regeneración axonal y el crecimiento de neuritas. Las propiedades que requiere un *scaffold* ideal son: biocompatibilidad; mínima respuesta inflamatoria; control de la biodegradabilidad, siendo no tóxicos los productos de su degradación; porosidad controlada, que permita la vascularización y la migración de células; y formar una matriz tridimensional cuyas propiedades mecánicas imiten a la matriz extracelular (ECM) [39]. Se puede diferenciar entre geles y esponjas. En los geles, el polímero es diseñado para imitar la matriz extracelular, controlando la estructura del tejido, distribuyendo los nutrientes, metabolitos y los factores solubles. Por otro lado, tenemos las esponjas que son estructuras tridimensionales porosas, más rígidas que los geles [30]. El *scaffold* puede ser implantado como tal o puede utilizarse cargado con un células madre susceptibles de una futura diferenciación según las condiciones fisiológicas en que se encuentran [41]. Los *scaffolds* pueden ser modificados imitando al ECM y así ayudar a la diferenciación y crecimiento de las células [42], favoreciendo a su integración, supervivencia, adherencia, acoplamiento y

extensión. Integrinas, péptidos y proteínas pueden ser añadidos al *scaffold* para facilitar la unión con las células.

Uno de los tipos de materiales ampliamente usados para *scaffolds* y *conduits*, destinados a la regeneración del tejido nervioso del sistema central y periférico, son los polímeros. Existe una amplia gama de polímeros disponibles con los que se puede trabajar y controlar la biodegradabilidad, la toxicidad, el poder anti-inflamatorio, las propiedades mecánicas y la porosidad. Entre ellos hay polímeros naturales (chitosan, chiton, colágeno, gelatina y alginato), polímeros sintéticos no degradables (silicona), sintéticos biodegradables (PLGA, poli ϵ -caprolactona, PCL, y ácido poliL-láctico ,PLLA) y polímeros conductores (polipirrol y polianilina) [39]. Existen numerosas técnicas para el conformado de los polímeros con el objetivo de obtener *scaffolds*: nanofibras por auto-ensamblaje, colado de disolvente y lixiviación de partículas, espumado con gas, emulsión y secado por congelado, separación de fases líquido-líquido y *electrospinning* asistido mediante diseño computacional [39]. Un conducto o un andamiaje ideal debería de ser flexible, poroso, biocompatible, biodegradable, neuroinductivo, neuroconductor y con unas propiedades mecánicas y superficiales apropiadas [43]. Las técnicas usadas para conformar los *scaffold* permitirán, por ejemplo, simular propiedades físicas la ECM formando estructuras tubulares que simulen microtúbulos, axones y dendritas [30]. En este grupo están los *scaffolds* de auto-ensamblaje compuestos de L-aminoácidos. La morfología también juega un papel importante aquí, condicionando el desarrollo celular, por ejemplo, dependiendo de la distancia entre fibras, las neuritas se pueden extender transversalmente o en la dirección de dichas fibras [44]. Además accidentes topográficos como hendiduras, colinas encadenadas, poros o nódulos, pueden actuar como guías que afectan a la adhesión, la migración y la proliferación y diferenciación celular del nuevo tejido [45]. La mojabilidad, también es otro parámetro importante, puesto que es crítico para la adhesión celular. Si la superficie del material es hidrófila, entonces las células tendrán más posibilidades de contactar con ella [46, 47].

En los últimos años, los hidrogeles se han colocado a la cabeza de los materiales desarrollados como *scaffolds* para su uso en reparación del tejido nervioso [39]. Esto se debe a sus propiedades químicas, mecánicas y dimensionales que son muy parecidas a la de

la matriz extracelular (ECM) de manera que funcionan como un excepcional soporte para la extensión de las neuritas y del axón [48], y para la proliferación y diferenciación celular. Otra de las ventajas es la posibilidad de ser inyectados. Uno de los hidrogeles más ampliamente usados en reparación del tejido del SNC es el PHPMA [49], el cual, además de ser biocompatible, posee propiedades neuroinductivas y neuroconductoras. Otros hidrogeles muy comunes usados como scaffolds y de naturaleza sintética son: óxido de polietileno (PEO), polivinil alcohol (PVA), ácido poliacrílico (PAA), polipropileno (furmarato-co-ethylen glicol) (P(PF-co-EG)), y polipéptidos [39, 50].

Nanotubos y nanofibras de carbono tienen un peso importante en la investigación de materiales debido a sus propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas y estructurales. En el campo de la medicina destinado a regeneración tisular estos materiales comienzan a despertar un interés cada vez mayor en lo que respecta a su modificación, con el fin de integrarlos en el cuerpo humano para destinarlos a regeneración de tejidos, entre ellos el tejido nervioso, y también en el tratamiento de enfermedades [51].

Materiales como los vidrios y las cerámicas parecen haber estado más reservados, hasta ahora, a la regeneración de tejidos mineralizados como el óseo. No obstante, el impulso en los últimos años de los composites polímero-cerámicos en el área de los biomateriales, ha dejado su huella en la rama dedicada a la regeneración de tejido nervioso [52].

1.4.2 Estimulación eléctrica en reparación del tejido nervioso

Entre las nuevas prótesis y tratamientos que se han empezado a desarrollar para la reparación de lesiones de la médula espinal, infartos cerebrales, deficiencias sensoriales (prótesis para la ceguera, de retina, corticales, para la audición, células madre cerebrales auditivas, etc...) y desordenes neurológicos (Parkinson, epilepsia, distonía o depresión) se encuentra el uso de estimulación eléctrica del tejido nervioso, así como, el registro de la actividad eléctrica neural. Estas prótesis y tratamientos se dirigen tanto al sistema nervioso central como al periférico y las propuestas incluyen estimulación eléctrica desde el interior

del tejido así como en la superficie del mismo. En la mayoría de las aplicaciones de estimulación eléctrica para tejido nervioso se usan pulsos bifásicos de corriente [23]. Sin embargo, también se propone en otros casos el uso de campo eléctrico (EF) en corriente continua (DC), no sólo para estimular la regeneración del tejido sino como guía para el crecimiento direccional de axones y dendritas [53].

El EF se aplica para la estimulación de diferentes tejidos excitables [54], el uso más conocido de esta técnica se ha aplicado en problemas de ceguera y del tejido cardiaco. La idea de usar EFs se basa en que en nuestro cuerpo existen y coexisten en equilibrio gradientes químicos, físicos y eléctricos, intra y extracelulares [55]. Las células hacen una lectura de estas señales que promueven procesos celulares como el ciclo celular, proliferación celular, migración de las células cancerosas (metástasis), migración de células neuronales en el embrión, reparación de la médula espinal, **regeneración de tejido epitelial**, control del desarrollo de la asimetría corporal (control de mecanismos durante el desarrollo del hígado, corazón...etc.) [56].

El modelo de **regeneración de tejido epitelial** de la cornea de un mamífero en una zona de lesión es un claro ejemplo de cómo se crea un campo eléctrico fisiológico que estimula el crecimiento y regeneración direccional de las células. El potencial transepitelial es de aproximadamente 40 mV debido al transporte iónico entre estroma y el fluido lagrimal. Según el modelo, en una zona de lesión, donde el tejido ha sido destruido, este potencial desciende a 0 mV, puesto que al no existir división entre ambas zonas tampoco existe transporte iónico entre los medios que las ocupan. Por tanto, entre la zona de tejido epitelial y la zona de lesión existe una diferencia de potenciales que genera un vector de campo eléctrico con dirección paralela al tejido y sentido hacia el centro de la lesión. Es este campo eléctrico, el que promueve el crecimiento y regeneración del tejido epitelial de manera convergente hacia el centro de la lesión (**Fig. 1.2**) [55-57].

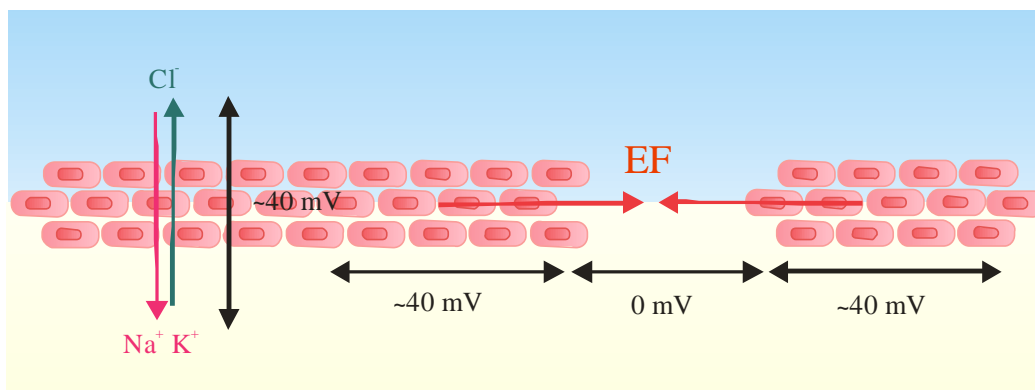
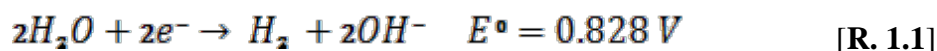


Fig. 1.2 Modelo de la cicatrización del tejido epitelial. La diferencia de potencial que se genera entre la zona de lesión y el tejido sano, provoca la existencia de un EF que promueve el crecimiento de nuevas células en la dirección y sentido del mismo, es decir, hacia el centro de la lesión o de manera convergente.

Entre los inconvenientes de la estimulación eléctrica se encuentra la posibilidad de que se produzcan reacciones electroquímicas irreversibles, tanto en la superficie del electrodo como en medio. Algunos ejemplos son, la electrólisis del agua [R. 1.1] [58] con el consiguiente cambio de pH y la formación de gases, la disolución del electrodo por la formación de complejos de óxidos metálicos solubles y oxidación de compuestos orgánicos como la glucosa y la tirosina [23, 59].



1.4.2.1 Electrodo en biomedicina

Para que la estimulación eléctrica en un tejido sea efectiva, es necesario que se transforme el flujo de electrones generado en el electrodo, en un flujo de iones capaz de llegar al tejido. Esta transformación se puede llevar a cabo por medio de dos mecanismos diferentes. El mecanismo **capacitivo de inyección de carga** transcurre mediante una carga-descarga de la doble capa electrodo-electrolito. La ventaja de este mecanismo y de los electrodos empleados es que no producen ni destruyen especies en el medio irreversiblemente, de manera que se pueda dañar al electrodo o al tejido que se encuentra en su proximidad. Para aumentar la capacidad en dichos electrodos es necesario jugar con la

porosidad del material o añadir capas con una alta constante dieléctrica. Como ejemplo de este tipo de electrodos se encuentra el nitruro de titanio (TiN). En el caso del TiN los límites de oxidación y reducción del agua se amplían en un rango desde -0.9 a 0.9 V, evitando así las reacciones irreversibles con el medio.

Por otro lado, está el mecanismo **faradaico de inyección de carga** en el que se producen reacciones de oxidación-reducción entre el electrolito y el electrodo.

Los metales nobles seleccionados para electroestimulación son el platino (Pt) y aleaciones de éste con iridio (Ir). Este tipo de materiales lleva a cabo la inyección de carga a través de ambos mecanismos. El que uno de ellos sea predominante dependerá de la densidad de carga inyectada y del ancho de pulso, no obstante, suele predominar el faradaico. Este tipo de electrodos son utilizados para estimulación intracortical e intraespinal, a pesar de que sus capacidades de inyección de carga son deficitarias para su aplicación como microelectrodos. Por ello, se intenta desarrollar microelectrodos con mayor capacidad de inyección de carga, y en este camino se encuentran los revestimientos de óxido de Iridio hidratado [23]. Estos revestimientos pueden ser obtenidos mediante dos protocolos: activación electroquímica de iridio metálico (AIROF) o el de la deposición mediante pulverización de una capa de óxido de iridio (SIROF) [60]. En el primer caso, revestimientos AIROF, la capa hidratada de óxido en la superficie se obtiene mediante sucesivas reacciones de oxidación y reducción alternadas. Así, la superficie activa aumenta de manera extraordinaria la capacidad de inyección de carga, siguiendo un mecanismo de tipo faradaico, reversible y muy rápido, donde están implicadas reacciones de oxidación y reducción entre Ir^{3+} e Ir^{4+} [61]. En segundo lugar, los revestimientos SIROF, se obtienen mediante la técnica de *sputtering* reactivo de Ir en un plasma oxidante. Esta técnica permite controlar la capacidad de carga y la morfología superficial mediante el control de las condiciones de *sputtering* [62]. Se realizó un estudio de la degradación que sufren unos revestimientos de AIROF y SIROF sobre puntas de microelectrodos Utah, sometidos a estimulación eléctrica funcional variando la amplitud y anchura de la corriente de pulso. Dicho estudio muestra que el límite de degradación de los revestimientos SIROF es superior al de los AIROF, y por tanto, son mejores para la aplicación (estimulación eléctrica). El límite de degradación del revestimiento depende de la carga inyectada y de la

densidad de carga por fase, las cuales, tienen una relación sinérgica. La estabilidad del IrO_x depende de las propiedades físicas como la densidad, la rugosidad, el espesor, así como los parámetros del pulso, en el caso de electroestimulación por pulsos. Dicha estabilidad es atribuida a la mayor densidad de un revestimiento SIROF, en comparación a un AIROF. Esta densidad se traduce en un mayor número de iones Ir, los cuales, disminuyen la polarización del material [60].

Actualmente, el uso de nuevos materiales para su aplicación como electrodos en biomedicina, está emergiendo. Este es el caso de polímeros conductores, ya mencionados en el apartado 1.4.1 dedicado a *conduits* y *scaffolds*, como el polietilendioxitiofeno (PEDOT) [63, 64], polipirrol o la polianilina. Dichos materiales son capaces de neutralizar radicales como el DPPH·, lo que es un indicativo de su biocompatibilidad [65]. Recientes investigaciones han mostrado interesantes resultados que apoyan el uso de PEDOT dopado con poliestireno sulfonado (PSS) para su uso en neuroprótesis, ya que además de no ser cito-tóxico, permite controlar el comportamiento celular mediante electroestimulación gracias a sus excelentes propiedades electroquímicas [63]. Otro de los materiales también mencionados con anterioridad, por sus propiedades conductoras, gracias a las cuales se proponen para su uso como electrodos, son los nanotubos y fibras de carbono [23]. Debido a su geometría, los nanotubos se caracterizan por una elevada razón entre el área superficial electroquímica y el área supirfecial geométrica (ESA/GSA), que dota al material de una elevada capacidad de carga de tipo doble capa. El inconveniente que poseen es su citotoxicidad, no obstante, se ha desarrollado una modificación química que mejora su biocompatibilidad [66].

La superficie geométrica de los electrodos juega un papel determinante, ya que en referencia a ella se definirán los parámetros de densidad de carga y corriente, de manera que se mantenga un balance de carga entre la superficie del electrodo y el medio fisiológico o tejido. Que este balance se mantenga es importante para evitar que se produzcan daños en el electrodo así como en el tejido más próximo a éste [23].

1.5 Implantes, proceso inflamatorio y encapsulamiento

En las células de los mamíferos existen ciertas moléculas pro-oxidantes generadas a partir de nitrógeno y oxígeno. En las células eucariotas algunas de estas moléculas son radicales: el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical óxidonitroso (NO^{\bullet}), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peroxinitrito ($OONO^{\bullet}$) [67]. Dichas moléculas poseen un electrón desapareado que les confiere una altísima reactividad, ya que tienden a donar el electrón que les sobra o aceptar otro electrón para estabilizarse. Otras moléculas pro-oxidantes, como el H_2O_2 , no son radicales pero también se caracterizan por una elevada reactividad. Las células disponen de sistemas enzimáticos que mantienen un balance redox y evitan el estrés oxidativo. Muchas patologías vienen producidas por una alteración de este balance redox, que normalmente desencadena un proceso inflamatorio [2].

Cuando el organismo detecta un cuerpo extraño, hasta él llegan las denominadas células inflamatorias. Las primeras en llegar son los neutrófilos polimorfonucleares que segregan unas moléculas reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, RNS). Si dichas células se ven activadas por un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, se produce un aumento de la expresión de determinadas integrinas, lo cual, provoca una combustión respiratoria. Si la muerte celular se produce por *apoptosis* y posteriormente tiene lugar su fagocitosis, el proceso inflamatorio se resuelve con éxito. Pero si por el contrario, la muerte celular se produce por necrosis, tiene lugar un aumento en la liberación de mediadores pro-inflamatorios desequilibrando aún más el balance redox hacia la formación de especies reactivas y con ello retroalimentando el proceso inflamatorio [2, 68, 69].

El fin último del proceso inflamatorio es la encapsulación del agente extraño para aislarlo de los tejidos sanos e impedir que los infecte. La duración y la magnitud de la inflamación al implantar un material determinarán su estabilidad y biocompatibilidad, produciéndose en el peor de los casos la encapsulación y el rechazo del mismo.

En las últimas décadas, el titanio metálico se ha impuesto con gran éxito en la industria de los biomateriales para su uso en implantes dentales y prótesis ortopédicas [70] (**Fig. 1.3**). Dicho éxito reside en su gran biocompatibilidad, la cual, es debida a la fina capa

superficial de TiO_2 que se forma en el proceso de pasivación del titanio cuando éste entra en contacto con un medio acuoso, como es el caso del medio fisiológico [71]. Se ha demostrado, que esta fina capa de TiO_2 , que tiene un espesor de nanómetros, está involucrada en la elevada biocompatibilidad que presentan dichos implantes, siendo capaz de neutralizar los radicales libres que se producen en el proceso inflamatorio [72].

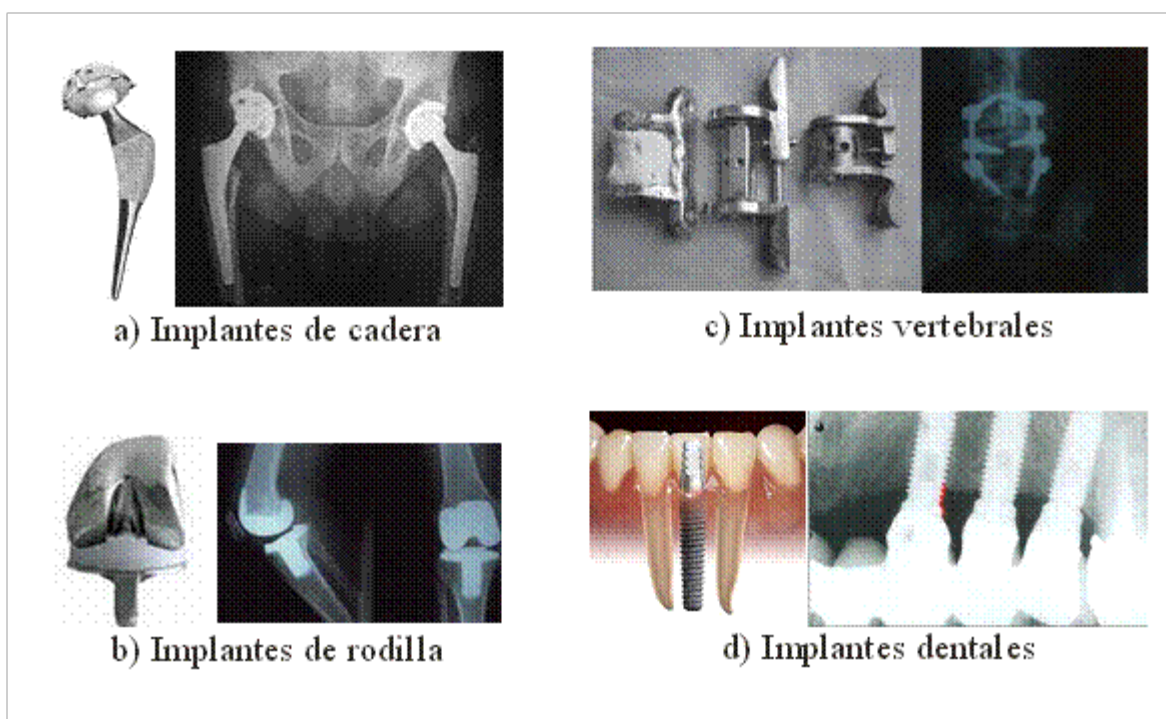
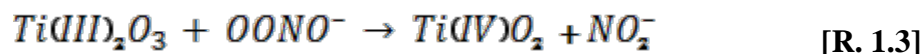
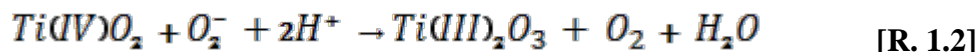


Fig. 1.3 Fotografías y radiografías de implantes de Ti.

Son muchos los trabajos experimentales que han reportado esta capacidad del TiO_2 de neutralizar especies reactivas, sin embargo, el mecanismo por el cual se producen dichas reacciones no ha sido del todo explicado. Basándose en la reacción de Fenton, por la cual, diferentes superficies metálicas son capaces de descomponer H_2O_2 en especies reactivas OH^- , OH^\cdot y O_2^- , además de H_2O y O_2 , se observó, la formación de un gel en la superficie del titanio que no se daba en otro metales en las mismas condiciones. Dicha descomposición se realiza gracias a los Ti (III) presentes que pasan a Ti (IV). Esta descomposición se produce de manera simultánea con la formación del complejo $\text{Ti-H}_2\text{O}_2$, cuyo producto final estable es el adducto TiOOH , y en ambos casos se ha observado que se encuentran hidratados. Será precisamente el gel formado por el complejo TiOOH , donde el

Ti está en estado de oxidación +4, el que mantiene amarradas las especie O_2^- y neutraliza la reacción de formación de $OH\cdot$ [73].

Dos décadas más tarde, probada la capacidad neutralizadora de especies reactivas como $ONOO^-$, los autores del trabajo sugieren que el mecanismo transcurre a través de reacciones de oxidación-reducción donde el titano pasa por los estados de oxidación +3 y +4, implicando en esta transformación posibles cambios de fase. [74] (R. 1.2 y 1.3):



Sin embargo, es sabido, que la reducción del TiO_2 a Ti_2O_3 requiere de unas condiciones agresivas, de alta temperatura y atmósfera reductora [21], por lo tanto, no es posible afirmar que estas reacciones puedan tener lugar en condiciones fisiológicas. No obstante, el factible pensar que el mecanismo de neutralización de estas especies pueda involucrar cambios en el estado de oxidación del titanio, de la misma manera que otras reacciones redox forman parte de procesos celulares, como el metabolismo y la respiración [68]. Además, en la continuación del trabajo seguido por los autores anteriormente citados, se probó la dependencia de la actividad antioxidante respecto a la concentración de Ti^{3+} . El aumento de Ti^{3+} en las muestras de TiO_2 mediante dopado o tratamiento térmico en vacío, daba lugar a un aumento de la actividad neutralizadora de radicales respecto a TiO_2 sin modificar [72].

Las fases de la serie de Mágnéli, donde el titanio se encuentra en estados de oxidación +3 y +4, como es el caso del Ti_4O_7 y Ti_5O_9 , podrían tener capacidad para neutralizar las especies reactivas que forman parte del proceso inflamatorio, y por tanto, ser buenos materiales biocompatibles.

1.6 El TiO_2

El óxido de Titanio, de fórmula TiO_2 , es la forma más estable en que se encuentra el titanio (Ti) en la Tierra, donde posee estado de oxidación IV. El TiO_2 adopta tres formas cristalográficas fundamentales: brookita (romboédrica, Pbca , $a = 5,436 \text{ \AA}$, $b = 9,166 \text{ \AA}$, $c = 5,135 \text{ \AA}$), anatasa (tetragonal, I41/amd $a = b = 3,782 \text{ \AA}$, $c = 9,502 \text{ \AA}$) y rutilo (tetragonal, P42/mnm , $a = b = 4,584 \text{ \AA}$, $c = 9,502 \text{ \AA}$) (**Fig. 1.4**) [75]. La banda de energías prohibidas del TiO_2 , va desde 3.0 eV en el caso de rutilo puro hasta 3.2 eV en el caso de la anatasa pura [76]. El cambio de fase de anatasa a rutilo, se produce entre los 600°C a 800°C (**Fig. 1.5**). Como ya ha sido mencionado, el rutilo es la fase más estable del TiO_2 , que existe, generalmente, en forma no-estequiométrica, TiO_{2-x} [77], con una compleja estructura de defectos. Cuando x es un valor pequeño ($x > 0.008$), los defectos predominantes son vacantes de O y Ti intersticiales [78, 79]. Estos defectos se han estudiado ampliamente en términos de defectos Schottky y Frenkel así como de vacantes de oxígeno y titanios intersticiales [80]. El que un tipo de defectos u otro sea dominante en el TiO_2 , viene determinado por las condiciones de temperatura y presión atmosférica de obtención del material [81]. Por ejemplo, en el caso de fase rutilo a baja temperatura, son los defectos Frenkel, los que parecen dominar según los cálculos teóricos [82]. Estos defectos cristalinos juegan un papel importante en las propiedades químicas y físicas que posee el material [83], teniendo una repercusión directa en sus propiedades eléctricas y fotocatalíticas.

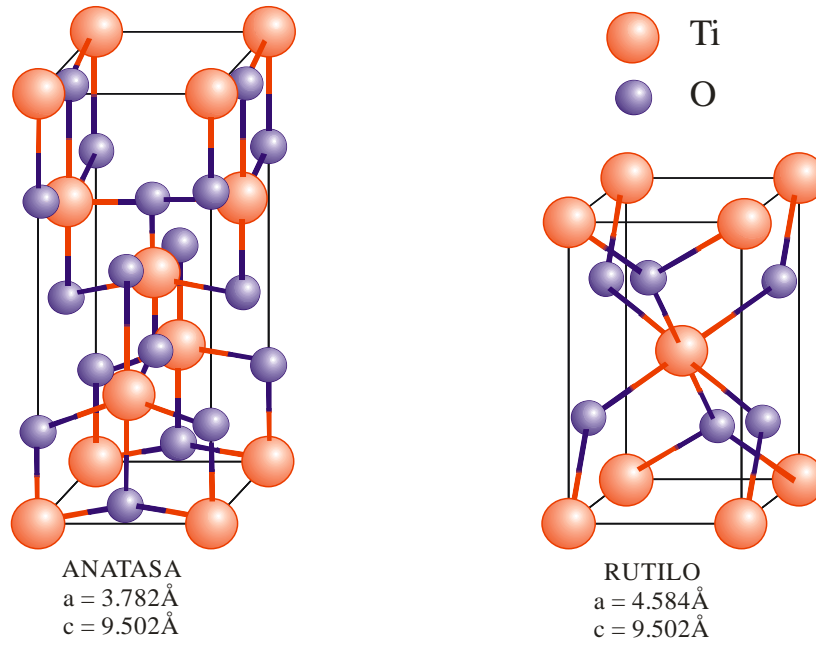


Fig. 1.4 Estructuras cristalográficas del TiO_2 en fase anatasa (estructura de la izqda.) y fase rutilo (estructura de la dcha.)

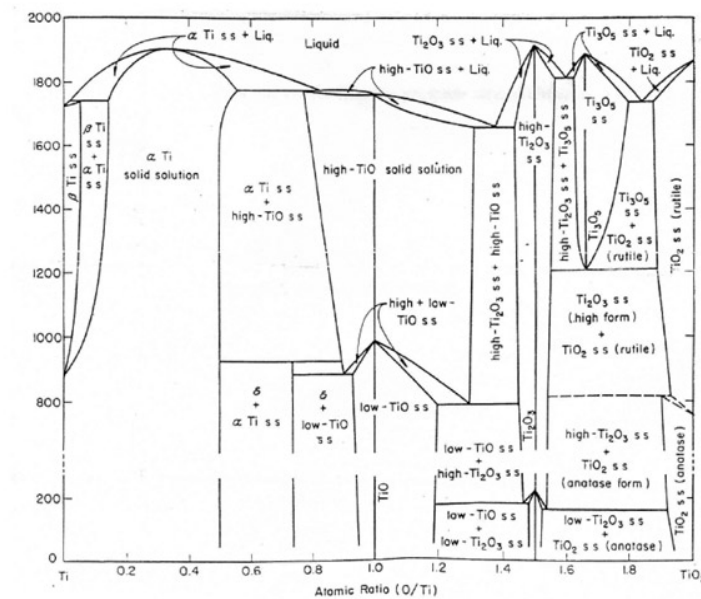


Fig. 1.5 Diagrama de fases del sistema Ti-TiO₂ [84]

En el caso de las propiedades eléctricas, el TiO_2 puede considerarse como un semiconductor de tipo “n”, sin embargo, se puede jugar con la concentración de defectos electrónicos [85], por ejemplo, mediante la aplicación de un campo eléctrico en el material que se encuentra inmerso en un fluido electrónico [86]. El objetivo es controlar la aniquilación de cargas móviles por recombinación y adecuar la estructura para el movimiento apropiado de iones y electrones a través de los defectos cristalinos [2]. Existe la posibilidad de modificar dichas propiedades eléctricas mediante la introducción de iones (dopado) en la estructura, de manera que la inserción de iones pentavalentes (Nb^{5+} o V^{5+}) aumenta la concentración de electrones, y de trivalentes (Fe^{3+}) [87] genera huecos electrónicos dando lugar a semiconductores tipo “p” [88].

Respecto a sus propiedades químicas, más en concreto, en lo referente a la química del material frente a especies radicales, presenta un comportamiento antagónico según las condiciones en que se use y en ambos casos tiene interesantes aplicaciones. En presencia de luz ultravioleta el TiO_2 es capaz de producir radicales libres gracias a su estructura de defectos y el valor de *Band Gap* que posee como material semiconductor. La incidencia de un fotón con una energía $h\nu$ igual o superior al *Band Gap* de material produce el salto de un electrón (e^-), desde su banda de valencia a la de conducción generando en la primera un hueco (h^+). Estas especies generadas son altamente reactivas y tienden a oxidar o reducir aquellas moléculas accesibles del entorno en que se encuentran, generando especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Esta propiedad se usa en fotocatalisis, para depuración de aguas y a nivel médico en foto-aniquilación de células cancerosas o bacterias [20, 89-92]. Sin embargo, en ausencia de luz, el TiO_2 es capaz de eliminar dichas especies radicales libres [72, 74]. Esta habilidad que presenta el TiO_2 para neutralizar radicales juega un papel importantísimo en la biocompatibilidad del Ti metálico, como ya se explicó en el apartado anterior, 1.5 Implantes, proceso inflamatorio y encapsulamiento.

1.6.1 Aplicaciones del TiO₂ como biomaterial

Aunque el TiO₂ no es uno de los materiales mencionados en la clasificación de las biocerámicas, sí ha sido indirectamente utilizado durante las últimas décadas, en las cuales, diferentes implantes dentales y prótesis ortopédicas de Ti metálico se han empleado con gran éxito. Debido al éxito de Ti en estos implantes, muchos de los estudios del TiO₂ como biomaterial se han encaminado a la interacción del mismo con las células, sobre todo del tejido óseo, como osteoblastos [27]. La adhesión de las células a la superficie se realiza mediante la interacción entre esta última y las proteínas de la membrana celular. Por tanto, la ordenación atómica de la superficie del material jugará un papel muy importante en la conformación que dichas proteínas adquieran durante la interacción. Existen casos en que la morfología que adquieren las células es un factor determinante en su viabilidad. Un ejemplo de ello, es el uso del TiO₂ como superficie para el cultivo *in vitro* de hepatocitos, se ha observado que las células no notan diferencias estructurales en las superficies de TiO₂ en cuanto a su adhesión, pero sí en sus viabilidades. [93-95]. Otros autores han propuesto recubrimientos con nanotubos de TiO₂ para prótesis coronarias. En este caso es indispensable que el implante sea colonizado por células endoteliales vasculares. Los nanotubos de TiO₂ ayudan a la diferenciación celular y favorecen la proliferación de células endoteliales [96].

Dos son las propiedades que hacen del TiO₂ un fuerte candidato como sustrato de implantes dirigidos a la reparación del SNC: su alta biocompatibilidad y sus propiedades electroquímicas, que le hacen apropiado para contemplar la posibilidad de electroestimulación en el implante [97, 98].

1.7 Fases de la serie de Magnéli: Ti_4O_7 y Ti_5O_9

Las fases de la serie de Magnéli son composiciones subestequiométricas de fórmula general $\text{Ti}_n\text{O}_{2n-1}$, donde $4 \leq n \leq 20$ [99]. En ellas, el Ti se encuentra en estado de oxidación +3 y +4 y la razón de O/Ti aumenta desde 1,75 a 2. En la **Tabla 1** se muestran algunas de las características físicas de estos óxidos:

Tabla 1. Características de las fases de la serie de Magnéli. Se muestran la razón O/Ti, las estructuras y densidades teóricas obtenida por difracción de Rayos X (DRX) de cada uno de los compuestos [21].

Compuesto	Valor x en TiO_x	Estructura	Densidad Teórica
TiO_2	2.00	Rutilo/Anatasa	4.25/3.89
$\text{Ti}_{10}\text{O}_{19}$	1.90	---	---
Ti_9O_{17}	1.89	Triclínica	3.75
Ti_8O_{15}	1.88	Triclínica	3.84
Ti_7O_{13}	1.86	Triclínica	3.90
Ti_6O_{11}	1.83	Triclínica	4.00
Ti_5O_9	1.80	Triclínica	4.31
Ti_4O_7	1.75	Triclínica	4.32
Ti_3O_5	1.67	Monoclínica	4.35
Ti_2O_3	1.50	Tetragonal	4.59

Estas fases muestran estructuras de defectos con organización a largo alcance. El estudio de las mismas por DRX muestra que dichas estructuras de defectos están formadas por vacantes de oxígeno en planos (**Fig. 1.6**) [80, 100].

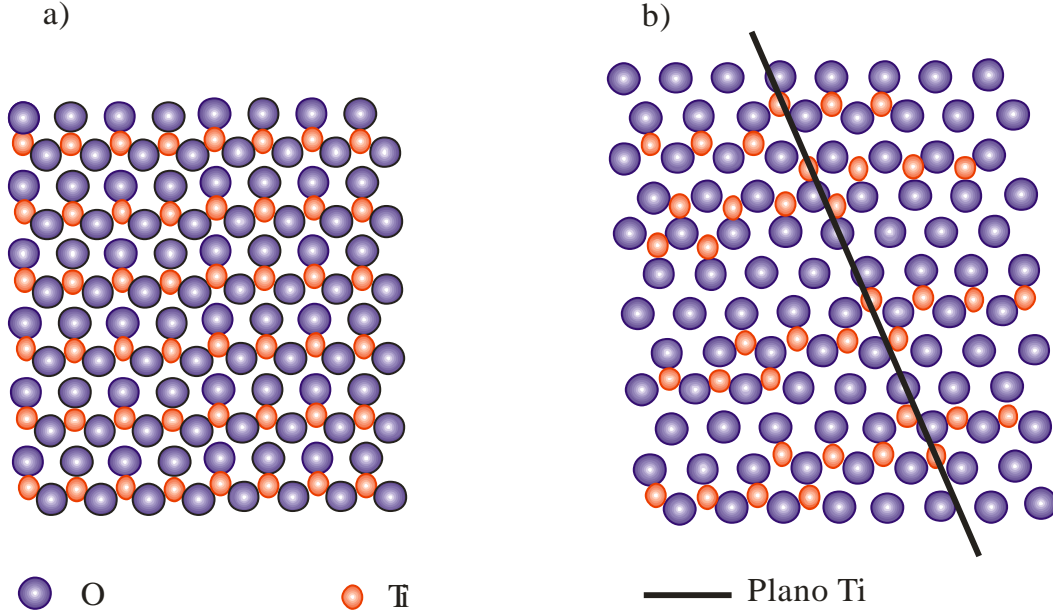


Fig. 1.6 Estructuras atómicas en el plano [100] de a) TiO_2 rutilo ideal y de b) Ti_4O_7 .

Como se ha explicado con anterioridad los defectos más comunes encontrados en el TiO_2 son vacantes de oxígeno y titanios intersticiales [80]. Si la energía de formación de un defecto aislado en el TiO_2 se calcula en base a la fórmula teórica [ec. 1]:

$$\Delta G_f(T, P_{O_2}) = \frac{1}{n_{\text{TiO}_2}} \left[G^{\text{superelda}}(T, P_{O_2}) + n_O^{\text{def}} \mu_O^{\text{ref}}(T, P_{O_2}) - G_{\text{TiO}_2}^{\text{denso}}(T, P_{O_2}) \right] \quad [\text{ec. 1.1}]$$

Si esta fórmula se aproxima a la energía de formación de una fase de Magnéli se obtiene [ec. 1.2]:

$$\Delta G_f^{\text{Ti}_n\text{O}_{2n-1}}(T, P_{O_2}) = \frac{1}{n_{\text{TiO}_2}} \left[E_{\text{Ti}_n\text{O}_{2n-1}}^{\text{superelda}}(\text{OK}) + n_O^{\text{def}} \mu_O^{\text{ref}}(T, P_{O_2}) - E_{\text{TiO}_2}^{\text{denso}}(\text{OK}) \right] \quad [\text{ec. 1.2}]$$

En base a estas aproximaciones teóricas, los datos experimentales muestran que para bajos potenciales químicos de oxígeno, los defectos de oxígeno llegados a una cierta concentración prefieren organizarse en planos para formar las estructuras propias de las fases de Magnéli [80]. La estructura cristalina se puede considerar basada en la del TiO_2 rutilo, y consiste en sucesivos bloques de éste separados por planos cristalográficos intercalados de TiO_6 . Los bloques de rutilo son infinitos en dos dimensiones y los planos n TiO_6 octaédricos en la tercera dimensión [100].

Existen varios procesos de reducción de TiO_2 como son la reducción electroquímica, la mecanoquímica y la carbotermal [9, 101-105], pero el principal proceso de obtención de las fases de Magnéli, actualmente comercializadas, es mediante reducción del TiO_2 por tratamiento térmico a temperaturas que superan los 1000°C en atmósferas reductoras de H_2 [21].

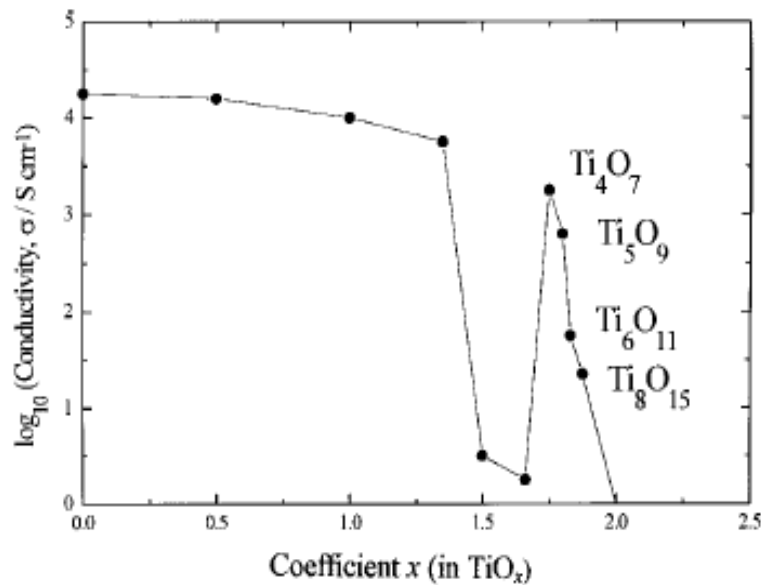


Fig.1.7 Conductividad eléctrica de diferentes composiciones sub-estequiométricas de óxido de titanio entre Ti y TiO_2 [18]

Estos materiales, que han sido ampliamente estudiados, presentan interesantes propiedades eléctricas y magnéticas. En el caso particular de las fases Ti_4O_7 y Ti_5O_9 , comercialmente conocidas como Ebonex[®], presentan una alta conductividad eléctrica (**Fig. 1.7**) a temperatura ambiente gobernada por un mecanismo de conducción vía “salto” electrónico. Su conductividad se caracteriza por una transición de mecanismos de conducción semiconductor-metal a una temperatura crítica entre 60° y 70°C. Aunque, la conductividad depende en gran medida del proceso de fabricación de dichos materiales debido a la presencia de grietas y poros que aumentan la resistencia del mismo. Además, estos materiales presentan una elevada resistencia a la corrosión incluso en condiciones muy agresivas. Gracias a estas propiedades una de las aplicaciones más interesantes de estos materiales es su uso como electrodos [106-110].

Bibliografía

1. Huebsch, N. and D.J. Mooney, *Inspiration and application in the evolution of biomaterials*. Nature, 2009. **462**(7272): p. 426-432.
2. Berta Moreno, M.C., J.R. Jurado, E. Chinarro, *Una revisión del uso de TiO₂ en terapias e ingeniería tisular*. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2009. **48** (6): p. 321-328.
3. Williams, D.F., *On the nature of biomaterials*. Biomaterials, 2009. **30**(30): p. 5897-5909.
4. Ratner, B.D. and S.J. Bryant, *Biomaterials: Where we have been and where we are going*. 2004. p. 41-75.
5. Gelain, F., A. Horii, and S. Zhang, *Designer self-assembling peptide scaffolds for 3-D tissue cell cultures and regenerative medicine*. Macromolecular Bioscience, 2007. **7**(5): p. 544-551.
6. Zhao, X. and S. Zhang, *Designer self-assembling peptide materials*. Macromolecular Bioscience, 2007. **7**(1): p. 13-22.
7. Ellis-Behnke, R.G., et al. *Nano neuro knitting: Using nanotechnology to repair the brain and spinal cord*. 2007. Santa Clara, CA.
8. Tysseling-Mattiace, V.M., et al., *Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury*. Journal of Neuroscience, 2008. **28**(14): p. 3814-3823.
9. Segadães, A.M., M.R. Morelli, and R.G.A. Kiminami, *Combustion synthesis of aluminium titanate*. Journal of the European Ceramic Society, 1998. **18**(7): p. 771-781.
10. Madri, J.A., B.M. Pratt, and A.M. Tucker, *Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor- β depends upon the composition and organization of the extracellular matrix*. Journal of Cell Biology, 1988. **106**(4): p. 1375-1384.
11. Massia, S.P. and J.A. Hubbell, *Covalently attached GRGD on polymer surfaces promotes biospecific adhesion of mammalian cells*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **589**: p. 261-270.
12. Shin, H., et al., *Attachment, proliferation, and migration of marrow stromal osteoblasts cultured on biomimetic hydrogels modified with an osteopontin-derived peptide*. Biomaterials, 2004. **25**(5): p. 895-906.
13. Rajnicek, A.M., K.R. Robinson, and C.D. McCaig, *The direction of neurite growth in a weak DC electric field depends on the substratum: Contributions of adhesivity and net surface charge*. Developmental Biology, 1998. **203**(2): p. 412-423.
14. Curtis, A. and m. Dalby, *Chapter 17: Cell response to nanofeatures in biomaterials*. Nombre del Libro. **Part II: Cell response and regenerative medicine**: p. 431-461.
15. De Aza, P.N., et al., *Bioactive glasses and glass-ceramics*. Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio, 2007. **46**(2): p. 45-55.
16. Hench, L.L., et al., *Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials*. Journal of Biomedical Materials Research, 1972. **5**(6): p. 117-141.
17. Tsapis, N., et al., *Trojan particles: Large porous carriers of nanoparticles for drug delivery*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(19): p. 12001-12005.
18. Altunbas, A., et al., *Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles*. Biomaterials, 2011. **32**(25): p. 5906-5914.
19. López, T., et al., *Pt/TiO₂ brain biocompatible nanoparticles: GBM treatment using the C6 model in Wistar rats*. Acta Biomaterialia, 2008. **4**(6): p. 2037-2044.

20. Elvira, G., et al., *Targeting neural stem cells with titanium dioxide nanoparticles coupled to specific monoclonal antibodies*. Journal of Biomaterials Applications, 2012. **26**(8): p. 1069-1089.
21. Silva, E.A., et al., *Material-based deployment enhances efficacy of endothelial progenitor cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(38): p. 14347-14352.
22. Edelman, E.R., et al., *In vitro and in vivo kinetics of regulated drug release from polymer matrices by oscillating magnetic fields*. Journal of Biomedical Materials Research, 1987. **21**(3): p. 339-353.
23. Cogan, S.F., *Neural stimulation and recording electrodes*. 2008. p. 275-309.
24. Martinez, A.W., S.T. Phillips, and G.M. Whitesides, *Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(50): p. 19606-19611.
25. Tathe, A., M. Ghodke, and A.P. Nikalje, *A brief review: Biomaterials and their application*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2010. **2**(SUPPL. 4): p. 19-23.
26. Sun, X. and T. Xi, *Third-generation biomedical materials and regenerative medicine*. Chinese journal of reparative and reconstructive surgery, 2006. **20**(2): p. 189-193.
27. De Aza, P.N., A.H. De Aza, and S. De Aza, *Crystalline bioceramic materials*. Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio, 2005. **44**(3): p. 135-145.
28. Roberto Sastre, S.d.A.y.J.S.R., *Biomateriales*.
29. Vallet-Regí, M., *Ceramics for medical applications*. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 2001(2): p. 97-108.
30. Orive, G., et al., *Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration*. Nature Reviews Neuroscience, 2009. **10**(9): p. 682-692.
31. Seil, J.T. and T.J. Webster, *Electrically active nanomaterials as improved neural tissue regeneration scaffolds*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2010. **2**(6): p. 635-647.
32. Perale, G., et al., *Hydrogels in spinal cord injury repair strategies*. ACS Chemical Neuroscience, 2011. **2**(7): p. 336-345.
33. Bellamkonda, R.V., *Peripheral nerve regeneration: An opinion on channels, scaffolds and anisotropy*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3515-3518.
34. Kim, Y.t., et al., *The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps*. Biomaterials, 2008. **29**(21): p. 3117-3127.
35. Fawcett, J.W. and R.A. Asher, *The glial scar and central nervous system repair*. Brain Research Bulletin, 1999. **49**(6): p. 377-391.
36. Pardridge, W.M., *The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development*. NeuroRx, 2005. **2**(1): p. 3-14.
37. Orive, G., et al., *Cell encapsulation: Promise and progress*. Nature Medicine, 2003. **9**(1): p. 104-107.
38. de Vos, P., et al., *Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology*. Biomaterials, 2009. **30**(13): p. 2559-2570.
39. Subramanian, A., U.M. Krishnan, and S. Sethuraman, *Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration*. Journal of biomedical science, 2009. **16**: p. 108.
40. Hurtado, A., et al., *Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-l-lactic acid microfibers*. Biomaterials, 2011. **32**(26): p. 6068-6079.
41. Kulbatski, I., et al., *Endogenous and exogenous CNS derived stem/progenitor cell approaches for neurotrauma*. Current Drug Targets, 2005. **6**(1): p. 111-126.
42. Potter, W., R.E. Kalil, and W.J. Kao, *Biomimetic material systems for neural progenitor cell-based therapy*. Frontiers in Bioscience, 2008. **13**(3): p. 806-821.

43. Verreck, G., et al., *Preparation and physicochemical characterization of biodegradable nerve guides containing the nerve growth agent sabeluzole*. Biomaterials, 2005. **26**(11): p. 1307-1315.
44. Nisbet, D.R., et al., *Interaction of embryonic cortical neurons on nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering*. Journal of Neural Engineering, 2007. **4**(2): p. 35-41.
45. Yim, E.K.F., et al., *Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells*. Biomaterials, 2005. **26**(26): p. 5405-5413.
46. Vargas-Garcia, A., et al., *Effect of grafting on microstructure, composition and surface and transport properties of ceramic membranes for osmotic evaporation*. Separation and Purification Technology, 2011. **80**(3): p. 473-481.
47. Zanchetta, P. and J. Guezennec, *Surface thermodynamics of osteoblasts: Relation between hydrophobicity and bone active biomaterials*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001. **22**(4): p. 301-307.
48. Woerly, S., R. Marchand, and G. Lavallee, *Intracerebral implantation of synthetic polymer/biopolymer matrix: A new perspective for brain repair*. Biomaterials, 1990. **11**(2): p. 97-107.
49. Woerly, S., et al., *Heterogeneous PHPMA hydrogels for tissue repair and axonal regeneration in the injured spinal cord*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1998. **9**(7): p. 681-711.
50. Drury, J.L. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4337-4351.
51. Tran, P.A., L. Zhang, and T.J. Webster, *Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009. **61**(12): p. 1097-1114.
52. Yang, Y.C., et al., *Sciatic nerve repair by reinforced nerve conduits made of gelatin-tricalcium phosphate composites*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2011. **96 A**(2): p. 288-300.
53. McCaig, C.D., et al., *Has electrical growth cone guidance found its potential?* Trends in Neurosciences, 2002. **25**(7): p. 354-359.
54. Bassar, P.J. and B.J. Roth, *New currents in electrical stimulation of excitable tissues*. 2000. p. 377-397.
55. McCaig, C.D., et al., *Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential*. Physiological Reviews, 2005. **85**(3): p. 943-978.
56. McCaig, C.D., B. Song, and A.M. Rajnicek, *Electrical dimensions in cell science*. Journal of Cell Science, 2009. **122**(23): p. 4267-4276.
57. Song, B., et al., *Nerve regeneration and wound healing are stimulated and directed by an endogenous electrical field in vivo*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(20): p. 4681-4690.
58. Zoski, C.G., *Handbook of electrochemistry*.
59. Merrill, D.R., M. Bikson, and J.G.R. Jefferys, *Electrical stimulation of excitable tissue: Design of efficacious and safe protocols*. Journal of Neuroscience Methods, 2005. **141**(2): p. 171-198.
60. Negi, S., et al., *Neural electrode degradation from continuous electrical stimulation: Comparison of sputtered and activated iridium oxide*. Journal of Neuroscience Methods, 2010. **186**(1): p. 8-17.
61. Mozota, J. and B.E. Conway, *Surface and bulk processes at oxidized iridium electrodes-I. Monolayer stage and transition to reversible multilayer oxide film behaviour*. Electrochimica Acta, 1983. **28**(1): p. 1-8.
62. Klein, J.D., S.L. Clauson, and S.F. Cogan, *Influence of substrate bias on the morphology and charge capacity of rf-sputtered iridium oxide films*. Journal of Materials Research, 1989. **4**(6): p. 1505-1510.
63. Collazos-Castro, J.E., et al., *Bioelectrochemical control of neural cell development on conducting polymers*. Biomaterials, 2010. **31**(35): p. 9244-9255.

64. Vaillant, J., et al., *Chemical synthesis of hybrid materials based on PANi and PEDOT with polyoxometalates for electrochemical supercapacitors*. Progress in Solid State Chemistry, 2006. **34**(2-4): p. 147-159.
65. Gizdavic-Nikolaidis, M., et al., *Conducting polymers as free radical scavengers*. Synthetic Metals, 2004. **140**(2-3): p. 225-232.
66. Banerjee, S., M.G.C. Kahn, and S.S. Wong, *Rational chemical strategies for carbon nanotube functionalization*. Chemistry - A European Journal, 2003. **9**(9): p. 1898-1908.
67. Kohen, R. and A. Nyska, *Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicologic Pathology, 2002. **30**(6): p. 620-650.
68. Zequería, D.E.B., *Vitáminas y oxidoreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo*. Revista Cubana de Investigación Biomédica, 2006. **25**.
69. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. Seminars in Immunology, 2008. **20**(2): p. 86-100.
70. Suzuki, R. and J.A. Frangos, *Inhibition of inflammatory species by titanium surfaces*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2000(372): p. 280-289.
71. Sahlin, H., et al., *Anti-inflammatory properties of micropatterned titanium coatings*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2006. **77**(1): p. 43-49.
72. Contreras, R., H. Sahlin, and J.A. Frangos, *Titanate biomaterials with enhanced antiinflammatory properties*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2007. **80**(2): p. 480-485.
73. Tengvall, P., et al., *Interaction between hydrogen peroxide and titanium: A possible role in the biocompatibility of titanium*. Biomaterials, 1989. **10**(2): p. 118-120.
74. Suzuki, R., et al., *Reactive oxygen species inhibited by titanium oxide coatings*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2003. **66**(2): p. 396-402.
75. Grant, F.A., *Properties of rutile (titanium dioxide)*. Reviews of Modern Physics, 1959. **31**(3): p. 646-674.
76. Zachariah, A., et al., *Synergistic effect in photocatalysis as observed for mixed-phase nanocrystalline titania processed via sol-gel solvent mixing and calcination*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(30): p. 11345-11356.
77. Waldner, P. and G. Eriksson, *Thermodynamic modelling of the system titanium-oxygen*. Calphad: Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry, 1999. **23**(2): p. 189-218.
78. Cho, E., et al., *First-principles study of point defects in rutile TiO_{2-x}* . Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics, 2006. **73**(19).
79. Dawson, I., et al. *First principles computer simulation of the defect chemistry of rutile TiO_2* . 1997. Boston, MA, USA: Materials Research Society.
80. Liborio, L. and N. Harrison, *Thermodynamics of oxygen defective Magnéli phases in rutile: A first-principles study*. Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics, 2008. **77**(10).
81. He, J., et al., *Prediction of high-temperature point defect formation in TiO_2 from combined ab initio and thermodynamic calculations*. Acta Materialia, 2007. **55**(13): p. 4325-4337.
82. He, J. and S.B. Sinnott, *Ab initio calculations of intrinsic defects in rutile TiO_2* . Journal of the American Ceramic Society, 2005. **88**(3): p. 737-741.
83. Yoshida, K., et al., *electron microscope study of the Ti_4O_7 phase in an annealed titanium oxide evaporated film*. Philosophical Magazine A: Physics of Condensed Matter, Structure, Defects and Mechanical Properties, 1981. **44**(1): p. 73-90.
84. Wong-Ng, W., et al., *Phase Equilibria and Crystallography of Ceramic Oxides*. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology, 2001. **106**(6): p. 1097-1134.

85. Jurado, J.R., E. Chinarro, and M.T. Colomer, *Ceramic conductors for electrochemical cell applications: New perspectives in materials and synthesis*. Solid State Ionics, 2000. **135**(1-4): p. 365-372.
86. Colomer, M.T. and J.R. Jurado, *Structural, microstructural, and electrical transport properties of $\text{TiO}_2\text{-RuO}_2$ ceramic materials obtained by polymeric sol-gel route*. Chemistry of Materials, 2000. **12**(4): p. 923-930.
87. Abrantes, J.C.C., et al., *Impedance spectroscopy study of niobium-doped strontium titanate ceramics*. Journal of the American Ceramic Society, 2002. **85**(11): p. 2745-2752.
88. Jurado, J.R., M.T. Colomer, and J.R. Frade, *Impedance spectroscopy of $\text{Sr}_{0.97}\text{Ti}_{1-x}\text{Fe}_x\text{O}_{3-\delta}$ materials with moderate Fe-contents*. Solid State Ionics, 2001. **143**(2): p. 251-257.
89. Fujishima, A., et al., *Biochemical application of photoelectrochemistry: photokilling of malignant cells with TiO_2 powder*. Electrochimica Acta, 1993. **38**(1): p. 153-157.
90. Huang, N., et al., *Photochemical disinfection of Escherichia coli with a TiO_2 colloid solution and a self-assembled TiO_2 thin film*. Supramolecular Science, 1998. **5**(5-6): p. 559-564.
91. Xu, M., et al., *Photoexcited TiO_2 nanoparticles through $\cdot\text{OH}$ - radicals induced malignant cells to necrosis*. Supramolecular Science, 1998. **5**(5-6): p. 449-451.
92. Huang, N.P., et al., *The study of the photokilling effect and mechanism of ultrafine TiO_2 particles on U937 cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1997. **108**(2-3): p. 229-233.
93. Petronis, S., et al., *Microstructuring ceramic scaffolds for hepatocyte cell culture*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2001. **12**(6): p. 523-528.
94. Nakazawa, K., et al., *Hepatocyte spheroid formation on a titanium dioxide gel surface and hepatocyte long-term culture*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2006. **17**(4): p. 359-364.
95. Buchloh, S., et al., *Hepatocyte performance on different crystallographic faces of rutile*. Biomaterials, 2003. **24**(15): p. 2605-2610.
96. Peng, L., et al., *The effect of TiO_2 nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation*. Biomaterials, 2009. **30**(7): p. 1268-1272.
97. Collazos-Castro, J.E., et al., *Neural cell growth on TiO_2 anatase nanostructured surfaces*. Thin Solid Films, 2009. **518**(1): p. 160-170.
98. Carballo-Vila, M., et al., *Titanium oxide as substrate for neural cell growth*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2009. **90**(1): p. 94-105.
99. Hayfield, P.C.S., *Development of a New Material Monolithic Ti4o7 EBONEX® Ceramic*. Royal Society of Chemistry, 2002 **Chapter 2**: p. 9-46.
100. Watanabe, M., *Raman spectroscopy of charge-ordered states in Magnéli titanium oxides*. Physica Status Solidi (C) Current Topics in Solid State Physics, 2009. **6**(1): p. 260-263.
101. Patil, S.S.M.y.K.C., *Combustion Synthesis of Metal Chromite Powders*. J. Am. Ceram. Soc. communications of the american ceramic society, 1992. **75** (4): p. 1012-1015.
102. Eick, B.M. and J.P. Youngblood, *Carbothermal reduction of metal-oxide powders by synthetic pitch to carbide and nitride ceramics*. Journal of Materials Science, 2009. **44**(5): p. 1159-1171.
103. Chen, G.Z., D.J. Fray, and T.W. Farthing, *Direct electrochemical reduction of titanium dioxide to titanium in molten calcium chloride*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 361-364.
104. Veljković, I., et al., *Mechanochemical synthesis of nanocrystalline titanium monoxide*. Materials Letters, 2008. **62**(17-18): p. 2769-2771.
105. Hauf, C., R. Kniep, and G. Pfaff, *Preparation of various titanium suboxide powders by reduction of TiO_2 with silicon*. Journal of Materials Science, 1999. **34**(6): p. 1287-1292.
106. Walsh, F.C. and R.G.A. Wills, *The continuing development of Magnéli phase titanium sub-oxides and Ebonex® electrodes*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(22): p. 6342-6351.

107. Bejan, D., et al., *Mechanistic investigation of the conductive ceramic Ebonex[®] as an anode material*. *Electrochimica Acta*, 2009. **54**(23): p. 5548-5556.
108. Miller-Folk, R.R., R.E. Nofle, and D. Pletcher, *Electron transfer reactions at Ebonex ceramic electrodes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1989. **274**(1-2): p. 257-261.
109. Smith, J.R., F.C. Walsh, and R.L. Clarke, *Electrodes based on Magnéli phase titanium oxides: The properties and applications of Ebonex[®] materials*. *Journal of Applied Electrochemistry*, 1998. **28**(10): p. 1021-1033.
110. Baez, V.B., J.E. Graves, and D. Pletcher, *The reduction of oxygen on titanium oxide electrodes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1992. **340**(1-2): p. 273-286.

Capítulo II

II Métodos de síntesis, procesamiento y caracterización de materiales

2.1 Síntesis

Los principales materiales objeto de estudio en este trabajo doctoral son: TiO_2 , $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ y TiN . Ti_4O_7 y Ti_5O_9 son fases sub-estequiométricas pertenecientes a la serie de Magnéli, las cuales, son obtenidas por reducción del TiO_2 . El TiN , por otra parte, será obtenido mediante un proceso de nitruración, también desde el TiO_2 . Por tanto, la obtención de la mayor parte de los materiales usados en este trabajo comienza con la síntesis del TiO_2 . Esta síntesis se llevará a cabo por el método sol-gel y posterior precipitación. Debido a su peso en este trabajo, se le dedicará gran parte del próximo capítulo, Capítulo III, a su síntesis y caracterización.

Otro material que será objeto de estudio es el CeO_2 . Este material se ha sintetizado con el objeto de estudiar su actividad en la neutralización de especies reactivas y mecanismo por el cual las elimina. También se realiza la síntesis de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$, para, posteriormente, poder sinterizarlo con el objetivo de obtener muestras densas para el mismo estudio. La síntesis, tanto del CeO_2 como del $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ se llevó a cabo por el método de combustión

2.1.1 Método sol-gel y posterior precipitación

El TiO_2 cerámico en polvos se obtiene en dos etapas, mediante la preparación de un gel transparente conseguido por el método sol-gel, y su posterior precipitación.

El método de síntesis **Sol-Gel**, cuyo nombre proviene de la abreviación de los términos anglosajones **solution-gelification**, consiste la obtención de un gel mediante la deshidratación de una dispersión coloidal de óxidos e hidróxidos, el sol, con partículas de entre 1 nm y 1 μm . El proceso de sol-gel de compuestos organometálicos (alcóxidos) implica una hidrólisis irreversible del sol, en medio ácido o básico. De la hidrólisis ácida o electrófila resulta un gel, que generalmente, después de calcinarlo, forma el óxido correspondiente. En la hidrólisis básica o nucleófila se obtiene directamente el óxido. Los polvos obtenidos por sol-gel son nanométricos, de gran pureza y homogeneidad. Pero el problema de este método es la falta de precursores (alcóxidos) en algunos casos, y también el elevado precio de los mismos en otros.

En este trabajo, el gel se obtiene por tratamiento térmico a 60°C durante 24 horas de la dispersión del alcóxido isopropóxido de titanio (IV) en etanol absoluto. La precipitación de los polvos de TiO_2 tiene lugar durante la posterior hidrólisis generada al poner en contacto el sol con el H_2O atmosférico. El disolvente se elimina por evaporación a temperatura ambiente. Todo el proceso queda descrito más ampliamente en el capítulo IV.

2.1.2 Método de combustión

Tanto CeO_2 como $(\text{CeO}_2)_{0.98} (\text{CaO})_{0.02}$ se obtendrán por el método de combustión [1, 2].

El método de combustión es un método de síntesis no convencional que tiene lugar gracias a la exotermicidad de la reacción entre un combustible y un oxidante o comburente [3-5]. Este método de síntesis ha sido ampliamente empleado desde el siglo XIX, cuando Beketov y Goldschmidt descubrieron que las reacciones auto-sustentadas térmicamente daban productos condensados. En 1967 tuvo lugar el descubrimiento del fenómeno de llama sólida, proceso de combustión, en el que tanto los reactivos como los productos están en estado sólido.

El método de síntesis por combustión, requiere un precursor oxidante, que suele ser un nitrato preferiblemente hidratado, para facilitar la existencia de un medio líquido que facilite la homogenización de la mezcla antes de la reacción, y un combustible, que aporte la energía necesaria para que se produzca la reacción, siendo uno de los más comúnmente utilizados la urea, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. Por este motivo se ha elegido en esta tesis como combustible en la síntesis de CeO_2 y $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$. La mezcla de reactivos se homogeniza y, como para su descomposición ha de recibir una aportación previa de calor, se calienta en una placa calefactora a 300°C . A esta temperatura los reactivos funden, el combustible descompone y la ignición tiene lugar. La energía liberada permite que se produzca la reacción de síntesis.

2.2 Tratamientos térmicos para la síntesis y el conformado de los materiales

Para la obtención de las diferentes fases y dispositivos finales de los materiales se requirieron diferentes tratamientos térmicos y conformados de los mismos, estos aparecen descritos a continuación.

2.2.1 Calcinación

El proceso de calcinación forma parte del procesamiento cerámico y es un tratamiento térmico, a temperaturas siempre por debajo del punto de fusión del producto a calcar, que tiene como objetivo el provocar una descomposición térmica o un cambio de estado cristalino de la muestra. En este trabajo las calcinaciones tienen lugar en presencia de aire. Este proceso se llevó a cabo sobre el material de TiO_2 en polvo con dos objetivos: el primero, la eliminación de compuestos orgánicos que permanecen en el material como residuos tras la reacción de síntesis, y en segundo lugar, el procesamiento del material en polvo para su preparación con distinta cristalinidad y estructura cristalina.

En el primero de los casos, para eliminar los residuos orgánicos del TiO_2 sintetizado en polvo, el tratamiento térmico alcanza 600°C y tiene una duración de 12h.

Cuando el proceso de calcinación se usa para la obtención de distintas proporciones de las fases rutilo/anatasa, se establecen las temperaturas de tratamiento adecuadas en base a estudio por difracción de rayos X (DRX) en función de la temperatura de calcinación, de esta manera se pueden establecer las temperaturas límite de cambio de fase. De una parte los polvos de TiO_2 , se calcinaron a 200°C y 400°C durante 12h en aire, para la obtención de TiO_2 en fase anatasa con distinta cristalinidad. Por otra parte, fueron sometidos a procesos de calcinación en aire a temperaturas de 600°C , 650°C , 700°C y 750°C con una duración de 12 h para obtener TiO_2 con distintos porcentajes de rutilo/anatasa en la muestra y distinto tamaño de cristalito. La cristalinidad de los polvos en estos casos no sufre variaciones significativas.

En el caso de las muestras de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$, el ciclo térmico elegido para la calcinación fue 600°C durante 12h. De esta manera se eliminaron los restos de orgánicos que pudieran ocasionar, durante el proceso de sinterización una porosidad no deseada.

En todos los casos las calcinaciones alcanzaron la temperatura elegida mediante velocidades de calentamiento y enfriamiento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$. Todas ellas se llevaron a cabo en una mufla MESTRA HP 25020 Programas.

2.2.2 Conformado de polvos calcinados

Desde los polvos calcinados, se procede al conformado de los mismos para su posterior sinterización con el objetivo de obtener discos densos y estructuras tridimensionales.

Tras la calcinación, los polvos son sometidos a un proceso de **molienda de bolas por atrición en húmedo**, el cual, disgrega los aglomerados formados por partículas más pequeñas y disminuye el tamaño del grano que se forma durante el proceso de calcinación mediante impacto y cizallamiento entre bolas y partículas. Es importante tanto el tamaño de las bolas como el material de las mismas, que sea duro y no provoque contaminaciones. En este caso la molienda se lleva a cabo con bolas de Ceria 1 mm en proporciones de masa 3:1 (bolas:polvos) en Etanol, rellenando con este hasta $2/3$ del volumen del molino.

Tras la síntesis de los polvos *recién preparados*, tanto previo a la calcinación, como después de la molienda de los polvos ya calcinados, se realiza un **tamizado** de los polvos. El tamizado simplemente pretende separar los aglomerados de mayor tamaño para eliminarlos de nuestro producto. De manera que sólo los aglomerados con un tamaño inferior al de la luz del tamiz seleccionado, son recolectados. En este caso se eligió una luz de malla de 100µm.

2.2.2.1 Conformado de polvos calcinados para fabricación de discos densos

Para obtener muestras conformadas como discos densos, los materiales en polvo se prensan isostáticamente para posteriormente ser sinterizados. El **prensado isostático**, consiste en un prensado con la misma presión en todas las direcciones del volumen. Nos permite compactar los polvos de manera que no se produzcan direcciones preferenciales en la organización de los granos o su morfología. El prensado se realiza con una presión de 1200Kg/cm² en una prensa isostática NF[®] nacional Forge Europe.

De aquí se obtiene una muestra compacta de geometría cilíndrica, que se somete a un tratamiento de sinterización en aire a 1400°C durante 4h, una vez densificada se corta en una **micro-cortadora** perpendicularmente al eje del cilindro para obtener los discos sobre los que se realizarán los estudios. Se preparan discos de dos dimensiones diferentes, unos de 5mm de diámetro por 3mm de alto, y otros de 20mm de diámetro por 1 mm de alto (**Fig 2.1**).

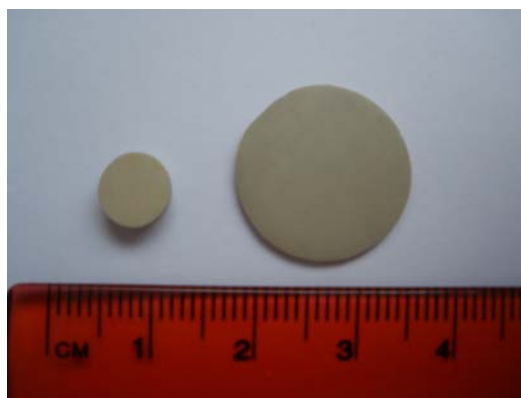


Fig. 2.1 Discos densos de TiO₂ obtenidos tras el prensado isostático de los polvos *calcinados* y su posterior sinterización. A la izq. disco de 5mm de Ø por 3mm de alto. A la dcha. disco de 20mm de Ø por 1mm de alto.

2.2.2.2 Conformado de polvos calcinados para fabricación de estructuras tridimensionales

Para obtener estructuras tridimensionales en forma de tubos, conductos o *conduits*, y esponjas o *scaffolds*, se usan polímeros no termoestables como moldes o *templates*, que son impregnados con una suspensión de los polvos del material que interesa. Tras dejar secar el molde impregnado se somete la muestra a un tratamiento térmico que consta de dos etapas. La primera, para descomponer el polímero no termoestable del que está compuesto el molde que se transforma en CO₂ gas, para lo que se utiliza una rampa de calentamiento es de 1°C/min hasta 800°C. En la segunda se sinteriza el conformado conseguido tras eliminar el molde correspondiente; el ciclo térmico, que es continuación de la etapa anterior, comienza elevando la temperatura a 5°C/min desde 800°C hasta 1400°C, temperatura que se mantiene 2h. Este tratamiento tiene lugar en un horno Agni GmbH de 1800°C con puerta tipo elevador y controlador Eurotherm.

2.2.3 Sinterización

La sinterización de materiales cerámicos consiste en la transformación de un producto en polvo compactado en verde en otro con mayor densidad mediante un tratamiento térmico. Este proceso se realiza a temperaturas altas pero por debajo del punto de fusión del compuesto que se desea sinterizar. A estas temperaturas las partículas coalescen por difusión. De esta manera, en las superficies de contacto entre las partículas se produce difusión atómica provocando una unión química.

Los discos densos de TiO₂ se plantearon como sustratos bidimensionales para cultivos celulares [6]. En base a estudios realizados, que se muestran en el siguiente capítulo, donde se realizaron cultivos celulares sobre superficies de TiO₂ denso, obtenidas por diferentes temperaturas (T_s) y tiempos (t_s) de sinterización ($1200^\circ\text{C} \geq T_s \geq 1600^\circ\text{C}$ y t_s de 4 a 16h), dotando a la material de distintos tamaños de grano, se eligió el tratamiento de sinterización para el que se obtuvieron mejores resultados celulares. El proceso de sinterización elegido para sinterizar las muestras en aire, es de 1400°C durante 4h utilizando unas velocidades de calentamiento de 5°C/min. Este mismo tratamiento fue el que se usó para la sinterización de (CeO₂)_{0.98}(CaO)_{0.02}. Los

tratamientos de sinterización se llevaron a cabo en un horno Nabertherm Program controler S27.

2.2.4 Tratamientos térmicos en atmósfera controlada para preparación de materiales basados en titanio con conductividad eléctrica.

2.2.4.1 Reducción: Obtención de fases de Magneli Ti_4O_7 y Ti_5O_9

La obtención de las fases de Magneli, se lleva a cabo mediante reducción del TiO_2 , ya sea como polvo, o como sustratos densos, a temperaturas superiores a $1000^{\circ}C$ en condiciones de atmósfera reductora [7]. En la bibliografía se han propuesto otros métodos para la obtención de fases de Magneli, como son la reducción electroquímica, mecanoquímica y carbotérmica [8-11], pero el proceso empleado por la industria para la fabricación del material comercializado como EBONEX[®] (Ti_4O_7) es el anteriormente explicado [12].

Tras una primera prueba fallida, en la que se realiza un tratamiento térmico a $1400^{\circ}C$ durante 3 h en atmósfera de $N_2:H_2$ (90:10), se aumentó el tiempo de tratamiento térmico en las mismas condiciones de atmósfera hasta 12 h. Este tratamiento es el que se establece para obtener la fases de Magneli mencionadas en este trabajo. Previo a introducir el gas $N_2:H_2$ en la cámara del horno, es necesario crear vacío en el interior del mismo. La introducción de la mezcla $N_2:H_2$ (90:10) en el horno, crea una atmósfera reductora que se mantiene durante los procesos de calentamiento y el enfriamiento. El horno donde se realizó dicho tratamiento es un horno tubular horizontal dotado de un controlador Eurotherm. El flujo de gas se controla con ayuda de un rotámetro colocado antes del conducto de entrada de gas en el horno.

2.2.4.2 Nitruración: Obtención de TiN

El proceso de nitruración se usa a nivel industrial en metalurgia y especialmente en el endurecimiento de aceros. Se puede realizar mediante tratamiento térmico con gases y tratamiento iónico o por plasma. En el caso del tratamiento térmico en un horno, al calentar a $500^{\circ}C$ el NH_3 se descompone, obteniéndose N elemental [13]. Dicho N entra en contacto con la superficie del material y es capaz de penetrar y reaccionar con él. En el caso del tratamiento nitruración iónica o por plasma el tratamiento se realiza

dentro de un reactor donde se crea vacío previamente a introducir los gases de nitruración. Se establece un circuito eléctrico en el que la pieza a nitrurar es el ánodo, por efecto del calor el Nitrógeno molecular se descompone e ioniza. Con ello se produce la difusión del N por la superficie y la consiguiente formación de nitruros [14].

En este trabajo, para la obtención de nitruro de titanio (TiN) se usó como material de partida el TiO_2 sintetizado, tanto en polvo como conformado en discos densos. Este TiO_2 se trató térmicamente en atmósfera de amoníaco (NH_3) a temperaturas entre 700°C y 1200°C . De entre todos, el tratamiento térmico elegido por ser el más óptimo, en base a sus propiedades y de acuerdo a los objetivos planteados para el en este trabajo, fue el de 1100°C durante 3h. Las velocidades de calentamiento y enfriamiento fueron de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ y durante estos procesos se sustituyó el suministro de NH_3 por N_2 para disminuir el consumo de amoníaco

2.3 Caracterización de muestras

Los métodos de caracterización que se han usado para los materiales sinterizados y procesados en este trabajo doctoral se pueden dividir en:

- ❖ Medida de la distribución del tamaño de partícula
- ❖ Superficie específica: isoterma BET
- ❖ Análisis térmico
 - Análisis térmico diferencial y termogravimétrico (ATD-TG)
- ❖ Análisis químico de Nitrógeno
- ❖ Espectroscopías:
 - Difracción de Rayos-X (DRX)
 - Fluorescencia de Rayos-X por Dispersión de Energía (EDXRF)
 - Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)
 - Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)
 - ✓ Medidas de Absorbancia de disoluciones de DPPH·
 - ✓ Medidas de Band Gap

❖ Microscopías:

- Microscopía de luz de contraste para medida de ángulo de contacto.
- Microscopía óptica
- Microscopía electrónica de barrido (MEB)
- Microscopía de Fuerzas atómicas (AFM)
- Microscopía de Raman Confocal

❖ Caracterización electroquímica:

- Medida de la conductividad eléctrica en DC por el método de la cuatro puntas
- Espectroscopía de Impedancia compleja
- Voltametría cíclica
- Voltametría cíclica de electrodo rotatorio
- Ruido electroquímico

2.3.1 Medida de la distribución del tamaño de partícula

El tamaño medio y la distribución del tamaño de partícula en los polvos preparados fueron determinados mediante un analizador de pulso láser de la marca Malvern, modelo Mastersizer ®.

El sistema de medida se basa fundamentalmente en la dispersión que experimenta un haz de luz láser al interactuar con las partículas de sólido puestas en suspensión, dispersadas con ultrasonidos y colocadas en una cámara de flujo que las mantiene en suspensión durante la medida. Los ángulos con que el haz es dispersado dependen del tamaño de las partículas y/o aglomerados.

2.3.2 Superficie específica (isoterma BET)

La superficie específica de los materiales en polvo se ha medido con un equipo Monosorb Surface Area Analyzer de la firma Quantachrome Corporation, modelo MS-13. El método de medida se basa en la determinación de la cantidad adsorbida/desorbida de nitrógeno en la superficie del sólido. La medida es el resultado de integrar la señal diferencial de dos detectores de conductividad térmica situados antes y después de la muestra durante el proceso de adsorción/desorción. Es necesario realizar una calibración

previa, para conocer la cantidad absorbida o desorbida para la presión parcial de N₂ en la mezcla.

El cálculo del área superficial de un sólido se realiza aplicando la ecuación [Ec.2.1]:

$$S_s = \frac{N_m \cdot S_0}{w} \quad \text{Ec. 2.1}$$

Donde, S_0 es la superficie ocupada por 1 ml de adsorbato, w es el peso de la muestra y N_m es el volumen de la monocapa de N₂ adsorbido. Este último se obtiene aplicando el modelo de isoterma desarrollado por Brunauer y col. [Ec. 2.2] [15] (isoterma BET):

$$\frac{P}{N(P_0 - P)} = \frac{1}{N_m \cdot C} + \frac{C - 1}{N_m \cdot C} \cdot \frac{P}{P_0} \quad \text{Ec. 2.2}$$

Donde, P es la presión del adsorbato en equilibrio con la cantidad N de sustancia adsorbida, P_0 es la presión de saturación del adsorbato puro a la temperatura de la adsorción y C es una función de energía de interacción adsorbato-adsorbente, el cual, puede considerarse constante para el intervalo de fracciones molares de 0.05 a 0.35.

2.3.3 Análisis térmico diferencial y termogravimétrico (ATD-TG)

El análisis térmico, dentro del que se encuentran estas técnicas, relaciona cambios físicos y químicos experimentados por la muestra al cambiar la temperatura. En el ATD, la temperatura de una muestra se compara con la de un material de referencia inerte, $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, durante un cambio programado de temperatura. La temperatura de la muestra y la de la referencia deben ser la misma hasta que se produzca algún proceso térmico en la muestra, como fusión, descomposición o cambio en la estructura cristalina de la misma. En este caso, se observa como la temperatura de la muestra aumenta o disminuye con respecto a la de referencia. Cuando se produce una reacción endotérmica, la temperatura de la muestra disminuye con respecto a la de la sustancia de referencia, y esto da lugar a una fuerza electromotriz (f.e.m.) entre dos termopares idénticos que cuantifican el efecto. En el caso contrario, en una reacción exotérmica ocurre lo contrario, haciendo que la f.e.m. medida sea de signo contrario.

Mediante el estudio TG se detectan las variaciones de peso que se producen en el material al someterlo a un tratamiento térmico.

Las curvas de ATD y TG se obtienen simultáneamente por medio de un termoanalizador NETZSCH modelo STA-409, conectado a un PC, empleando alúmina calcinada como sustancia patrón, y crisoles de Pt sobre los que se coloca la muestra en atmósfera de aire seco (flujo = 7 l/min). La temperatura de calentamiento para ambos análisis fue de 3°C/min.

2.3.4 Análisis químico de Nitrógeno

El análisis de nitrógeno para los materiales de TiN fue realizado en un analizador diferencial LECO, modelo TC-436. Dicho analizador consta de un horno eléctrico estanco con dos electrodos, entre los que se introduce un crisol de grafito donde se coloca la muestra. El paso de una elevada intensidad de corriente permite que en pocos segundos el crisol pueda alcanzar hasta 3000°C, descomponiendo y volatilizand la muestra a analizar. Los gases procedentes de esta volatilización son arrastrados por una corriente de helio (99.99) hasta la unidad de reactivos y pasan a través de una columna de CuO para oxidar el CO a CO₂. El CO₂ junto con el N₂ pasan a través de una columna compartimentada con NaOH y Mg(ClO₄)₂ para separar el CO₂ y el vapor de agua del N₂. Midiéndose éste último en una celda de termoconductividad.

Las características del equipo son: tiempo de análisis, 40-60 segundos; potencia análisis, 5 kW; potencia purga del crisol, 5.5 kW; y tiempo de purga, 20 segundos

2.3.5 Difracción de rayos X (DRX)

La identificación estructural de los materiales estudiados durante este trabajo doctoral se ha realizado por DRX. Durante la realización del trabajo se han usado dos equipos diferentes, el primero en ser utilizado fue un difractómetro Siemens modelo D 5000, con un generador Kristalloflex 710. Se empleó radiación K α (Cu) (λ = 1.5405 Å), 50 KV, 30 mA y una velocidad de barrido de 2°/min y una velocidad de rotación de la muestra 15 rpm en el rango de 2θ = 10-70°. El segundo, es un equipo X'Pert PRO de Panalytical con geometría $\theta/2\theta$ y monocromador primario para longitud de onda K α_1 con incremento angular de 0,033°, un tiempo por incremento de 50 s, que detecta la

señal a través de un detector rápido multicanal (123 canales) y una velocidad de rotación de la muestra de 15 rpm, también en el rango de 10-70°.

Esta técnica no fue usada sólo para la identificación de estructuras y fases en nuestros materiales, sino que además, se calcularon los porcentajes de fases cristalinas de anatasa y rutilo. Para ello se analiza el espectro obtenido con un barrido lento, donde el incremento angular es de 0.003° y el tiempo por incremento 3s. mientras la velocidad de rotación de la muestra es de 15rpm, en el intervalo de 2θ (24-30°), donde se encuentran los picos más intensos de las fases rutilo y anatasa para el TiO_2 (**Fig. 2.2**), y siguiendo el método descrito por A. Zachariah, se calcula el porcentaje de cada una de las fases cristalinas presentes según la **Ec. 2.3** [16]. La cantidad de polvo fue siempre constante en todas las medidas.

$$\% \text{ peso en rutilo} = \frac{I_{110R} \times 100}{I_{110R} + (0.8)I_{101A}} \quad \text{Ec. 2.3}$$

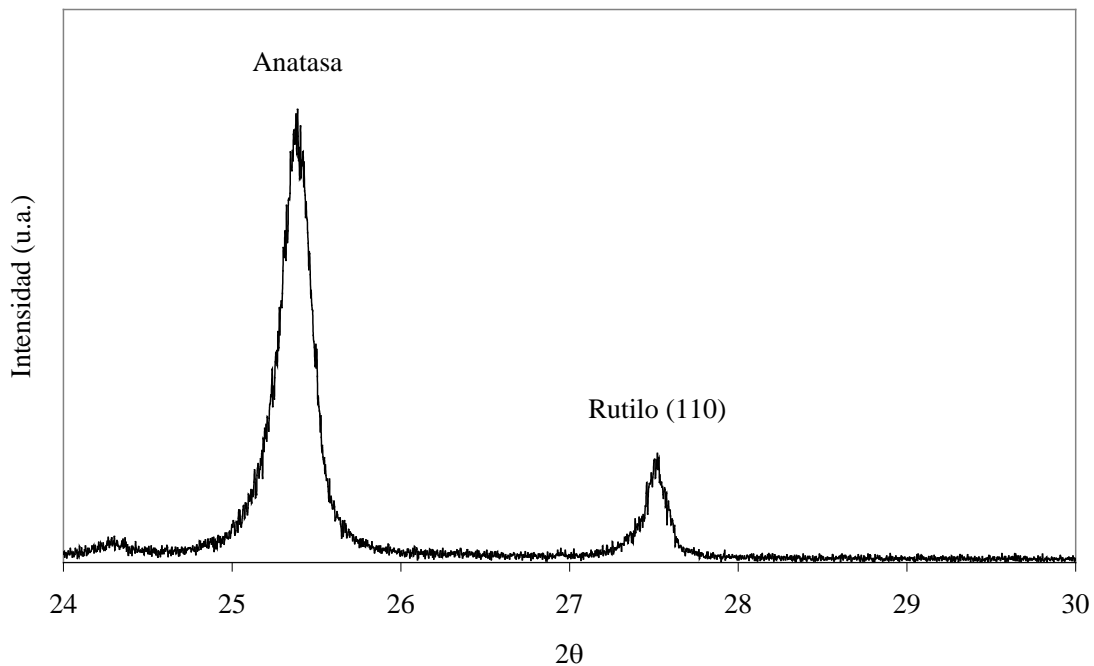


Fig. 2.2 Espectro de DRX entre $2\theta = 24-30^\circ$ para el cálculo de porcentajes de fases cristalinas de anatasa (A) y de rutilo (R) que se encuentran en el TiO_2 calcinado a 600°C.

2.3.6 Fluorescencia de Rayos-X por energía dispersiva (EDXRF)

La fluorescencia de rayos X es un método analítico capaz de determinar la composición química de todos los materiales. A veces puede ser usada también para determinar el espesor y la composición de láminas y capas. Dentro de ella el método se subdivide en dos grupos: energía dispersiva EDXRF (en cuyo rango de elementos se encuentra el Ti) y el de longitud de onda dispersiva WLXRF.

La técnica EDXRF mide la emisión secundaria o fluorescente de radiación X que se genera al excitar una muestra con una fuente emisora de rayos X. Los electrones se organizan y ordenan en orbitales dispuestos en niveles de energía alrededor del núcleo. Estos niveles se dividen en K, L_I, L_{II}, L_{III}, M_I, M_{II}, M_{III}, M_{IV}, M_{VI}, desde los niveles más internos a los más externos. Cuando un haz de radiación X incide en la materia, es capaz de expulsar los electrones de capas interiores del átomo dejando vacantes en estos niveles y al átomo en estado excitado e inestable. Por ello, los electrones de capas más externas pasan a ocupar los lugares vacantes en niveles de energía inferiores. El exceso energético resultante de esta transición se disipa en forma de fotones, es decir, como radiación X fluorescente. La energía dispersada en forma de radiación de fluorescencia es característica para cada elemento químico, lo cual permite la identificación de elementos dentro del espectro de la muestra si se conoce la diferencia de energía entre los niveles atómicos implicados. La concentración del elemento es proporcional a la intensidad de energía asociada a cada transición de electrones.

El equipo utilizado es espectrómetro Magix de Panalytical. Para los análisis de Ti se midió la λ ($K\alpha$) = 0.2749 nm usando un cristal de LiF 200 y la señal se recoge con un detector de centelleo.

2.3.7 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Esta técnica se ha utilizado para el estudio del estado químico de los elementos en superficie y, por lo tanto conocer la composición superficial de los materiales. En el caso concreto de este trabajo, se caracterizan las muestras de Ti_5O_9 y Ti_4O_7 , para conocer los estados de oxidación en que se encuentra el titanio así como el entorno de los mismos en la superficie de la muestra.

La técnica consiste en el bombardeo de la muestra con un haz intenso de rayos X blandos, monoenergéticos, que arrancan los electrones de los niveles atómicos más profundos, para terminar analizando la energía cinética de los fotoelectrones emitidos. El espectro que se obtiene es la representación del número de electrones emitidos por intervalo de energía frente a su energía cinética [17].

La energía cinética que poseen estos electrones está relacionada con la energía de ligadura que tiene el electrón al ocupar el nivel energético donde se encontraba dentro del átomo según la ecuación que describe el efecto fotoeléctrico [Ec. 2.4]:

$$E_c = h\nu - BE - \phi_s \quad \text{Ec. 2.4}$$

Donde, $h\nu$ es la energía del fotón incidente (normalmente Mg $K\alpha$ = 1253.6 eV o Al $K\alpha$ = 1486.6 eV), y BE es la energía de enlace del electrón. ϕ_s es la función de trabajo del espectrómetro con la que se corrige la ecuación clásica del efecto fotoeléctrico.

El resultado es un espectro en el que aparecen picos superpuestos al fondo continuo. Cada pico se asocia a un tipo de átomo presente en la muestra analizada, y normalmente, se refieren al átomo y nivel energético del que proceden, indicando símbolo y tipo de nivel. Esta técnica proporciona información química de las primeras 5-10 capas superficiales del sólido.

Generalmente se requiere de algún patrón interno para calibrar la energía de ligadura. El pico C_{1s} (BE = 284.9 eV), que aparece en todas las muestras, por contaminación de hidrocarburos adsorbidos del ambiente, es la referencia más usual.

Los espectros de XPS se adquirieron con un espectrómetro VG Escalab 200R equipado con un analizador hemisférico de electrones y una fuente de rayos X de Mg

$K\alpha$ ($h\nu = 1253.6$ eV, $1 \text{ eV} = 1.6302 \times 10^{-19}$ J) de 120 W de potencia. Las muestras en forma de polvo se colocan en un portamuestras de Inox 18/8 y se introducen en la cámara de pretratamiento, donde se desgasifica a 10^{-5} Torr antes de introducirla en la cámara de análisis. Previamente a la adquisición del espectro, la muestra se mantiene en la cámara de análisis bajo una presión residual de $2 \cdot 10^{-9}$ Torr durante unos minutos. Dicha presión no se varía durante la obtención de los datos. Los espectros se adquirieron a una energía de paso de 20 eV, energía típica en condiciones de alta resolución. Las intensidades se estiman a través del cálculo del área integral de cada pico después del suavizado, de la sustracción del fondo y del ajuste de la curva experimental a una mezcla de curvas Lorentzianas y Gaussianas en proporciones variables.

2.3.8 Medidas de absorbancia de luz ultravioleta-visible (UV-Vis): Medidas de *Band-Gap*

Las medidas de absorción en el rango del Ultra Violeta-Visible se llevaron a cabo con dos objetivos diferentes: el primero, medir las absorbancias de las disoluciones en los ensayos de DPPH· para la evaluación de la actividad neutralizadora de radicales, lo cual, se explicará de forma detallada en el apartado 3.4.2 de este capítulo. En un segundo lugar se emplearon para calcular el *Band Gap* de los materiales a partir del tratamiento matemático de los espectros.

Para medir el *Band Gap*, los espectros se registraron en el modo de reflectancia difusa (DR), con longitudes de onda entre 200-1000 nm. Para calcular a partir de ellos el *Band Gap*, es necesario realizar previamente la transformación de Kubelca-Munk de las medidas. El *Band Gap* se determina usando la ecuación propuesta por Van Leeuwen et al. (1995) [18] donde el coeficiente de absorción (α) está relacionado con la energía del fotón ($h\nu$). El coeficiente de absorción se determina desde la ecuación [ec. 2.5]:

$$e^{-\alpha t} = \frac{T}{(1 - R)^2} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Donde, t es espesor de la muestra, T la transmitancia y R la reflectancia.

Existen dos tipos de transiciones para que los electrones salten el *Band Gap*, una directa y otra indirecta, donde los electrones pasan por el nivel de Fermi. Las probabilidades cuánticas de dichas transiciones se calculan mediante la ecuación **Ec.2.6**, en el caso de la transición directa, y la ecuación **Ec. 2.7**, en el caso de la indirecta, (**Fig. 2.3**):

$$(\alpha E_\gamma)^2 \propto E_\gamma - E_{gd} \quad \text{Ec. 2.6}$$

$$\alpha \propto \frac{(E_\gamma + E_p - E_{gi})^2}{e^{(E_\gamma/kT)} - 1} + \frac{(E_\gamma - E_p - E_{gi})^2 e^{(E_\gamma/kT)}}{e^{(E_\gamma/kT)} - 1} \quad \text{Ec. 2.7}$$

Donde, E_γ es la energía del fotón, E_{gd} la energía de transición directa, E_{gi} la energía de transición indirecta y E_p la energía del fonón.

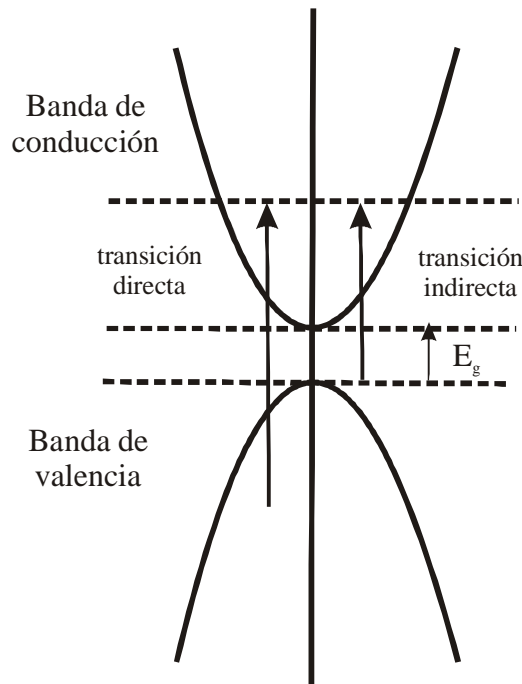


Fig. 2.3 Esquema de los bandas de valencia y conducción así como del *Band Gap* en un material semiconductor.

Los espectros de absorbancia se obtuvieron con un espectrofotómetro UV-Vis-IRC Lambda 950, Perkin Elmer, USA. A dichos espectros se le somete a la transformada de Kuvelka-Munt (K-M). De esta manera se obtienen las curvas de

porcentaje de Absorbancia (K-M) frente a la longitud de onda incidente. Desde estas medidas se calcula y representa la raíz cuadrada del coeficiente de absorción ($\alpha^{1/2}$) frente energía del fotón (E_γ). Del ajuste lineal de la pendiente de caída del coeficiente de absorción obtenemos el valor del *Band Gap* que se corresponde con la ordenada en el origen.

2.3.9 Microscopía por luz de contraste para medidas de ángulo de contacto

La medida del ángulo de contacto es método comúnmente usado en el estudio de superficies de biomateriales, ya que da una idea de la energía superficial y del comportamiento hidrófobo o hidrófilo de la superficie ante un medio acoso. Una buena interacción entre la superficie del material y el medio facilitará el contacto célula-material aumentando las posibilidades de adhesión [19].

El ángulo de contacto se mide por el método de la gota Sessile. Se deposita una gota sobre la superficie del material tomando micrografías del perfil mediante una cámara acoplada a un microscopio de luz por contraste. Sobre la micrografía tomada los 10 s (tiempo de estabilización) se estudia la forma y se calcula el ángulo de contacto (θ) por el método de Young-Laplace. Este método calcula el ángulo formado entre la superficie de la gota y la del material. Los ángulos inferiores a 90° indican un superficie hidrófila, mientras que los mayores a 90° pertenece a superficies hidrófobas. Dicho ángulo dependerá de las fuerzas adhesivas líquido-sólido y de las cohesivas líquido-líquido.

Las medidas se realizan en un Tensiometro Easy DROP standard de KRÜSS, provisto de una cámara digital.

2.3.10 Microscopía óptica

La lupa óptica consta de una lente convergente que permite obtener imágenes aumentadas. Algunas de las muestras, como los substratos 3-D con forma de tubos (*conduits*) o esponjas (*scaffolds*) fueron observados en una lupa óptica Nikon SMZ1000 con la cual se obtuvieron imágenes gracias a una cámara SONY CCD-IRIS Color video camera, acoplada a la lupa.

2.3.11 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La MEB se ha realizado con dos equipos diferentes. El primero es un equipo Zeiss-DSM 950, con un poder de resolución de 5 nm (30 KV). El voltaje acelerador empleado fue de 20 KV. Este equipo tiene acoplado un espectrómetro de dispersión de energías (EDX) Tracor Northern (mod. Micro Z-II) para realizar un análisis elemental de zonas o puntos de interés de la muestra. Para hacer la superficie de la muestra conductora, es necesario un recubrimiento conductor, grafito y oro. En nuestro caso el recubrimiento se realiza por *sputtering* en un plasma de Argón donde los iones creados inciden sobre un cátodo de Oro, y las partículas extraídas de la superficie de cátodo se depositan sobre la superficie de la muestra. Las muestras que son conductoras, por ejemplo aquellas cuya composición es $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$, no necesitan recubrimiento.

Por otro lado, algunas de las fotografías se han tomado en un equipo de sobremesa HITACHI TM-1000. Dicho microscopio de barrido permite la observación de las muestras sin metalizar por *sputtering*. Dispone de 20 a 10000X aumentos (Zoom digital 4X) y el voltaje de aceleración es de 16V.

Se han obtenido micrografías de muestras de TiO_2 , $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ y TiN en forma de polvos, discos densos y *scaffolds* (tubos y esponjas), tanto de las superficies de los materiales como de las zonas de fractura.

2.3.12 Microscopía de Fuerzas atómicas (AFM)

Este método de microscopía nos permite obtener imágenes de la topografía de una superficie, detectando accidentes topográficos del orden de nanómetros. Dichos accidentes son detectados mediante una punta cuyo radio de curvatura es del orden de nanómetros. La punta está acoplada a un cantiléver compuesto de silicio o nitruro de silicio. La proximidad de la punta a la superficie del material provoca la aparición de fuerzas entre ambos, lo cual se traduce en una deflexión del cantiléver de acuerdo la ley de Hook. La naturaleza de las fuerzas que aparecen puede ser de tipo mecánico, atracciones electroestáticas, fuerzas de Van Der Waals o de tipo químico. Por otro lado, existen dos modos de medida diferentes: el modo de contacto y de no contacto. En el modo de contacto la punta del cantiléver se encuentra en un estado de deflexión estático. Se realiza casi siempre por contacto de la punta del cantiléver con la superficie

de la muestra. En el modo de no contacto la punta del cantiléver se encuentra en un modo de oscilación resonante donde la frecuencia de oscilación es $\leq 10\text{nm}$.

Las micrografías obtenidas por AFM se han realizado en un Microscopio de Fuerzas Atómicas Cervantes, NANOTEC Electrónica. Para el tratamiento de las imágenes obtenidas se usa un *software* WSxM 5.0 Develop 4.2. Se utilizó para el estudio de muestra de TiO_2 conformado como discos densos y de $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ obtenidos por reducción, en alta temperatura en atmósfera reducida, a partir de los anteriores. En este caso las micrografías se obtuvieron en modo de contacto.

2.3.13 Espectroscopía de microRaman acoplada a microscopio óptico Confocal

Las moléculas se componen por átomos que se encuentran unidos a través de enlaces químicos. A través de estos enlaces las moléculas están sometidas de manera constante a movimientos oscilatorios de naturaleza rotacional y vibracional. Dichas oscilaciones se realizan a frecuencias concretas y por tanto les corresponde un valor determinado de la energía molecular.

Cuando un fotón incide con la materia, la molécula se traslada a un nivel de energía rotacional o vibracional superior no permitido y que por tanto ha de abandonar rápidamente. Al regresar de nuevo a un nivel energético menor y permitido emite un fotón. Según el intercambio energético que tiene lugar tras el choque fotón-molécula, podemos distinguir dos tipos:

- ✓ Choque Elástico: No hay intercambio de energía puesto que el nivel energético de partida y llegada es el mismo y el fotón incidente y emitido tienen igual número de onda. Lo que ocurre es una dispersión de tipo Rayleigh.
- ✓ Choque Inelástico: El fotón incidente y el emitido tienen diferente energía. Podemos distinguir dos casos:
 - Cuando el fotón dispersado posee menor número de onda y la molécula finaliza en un estado permitido de energía mayor al inicial. Tiene lugar una dispersión Raman Stokes.

- En el caso contrario el fotón dispersado posee mayor número de onda y la molécula finaliza en un estado permitido de energía menor al inicial dando lugar a una dispersión anti-Stokes.

En la espectroscopía Raman se hace incidir un haz de luz monocromática sobre el material y se estudia la luz dispersada por cualquiera de los mecanismos anteriormente descritos.

La espectroscopía Raman de las muestras de TiO_2 y TiN se ha realizado con un Raman Confocal Witec α 300 RA, con un microscopio de fuerzas atómicas acoplado a él.

2.4 Estudio de la actividad neutralizadora de especies radicales

Este trabajo fue realizado en colaboración con el Instituto de Ingeniería Biomédica (INEB) en Oporto, Portugal, durante una serie de estancias predoctorales realizadas allí.

La evaluación de la capacidad neutralizadora de los óxidos de titanio se llevó a cabo por dos métodos diferentes: Ensayo con *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical* (DPPH \cdot) y ensayo con *3-Morpholinocydonimine hydrochloride* (SIN-1) que se explican a continuación:

2.4.1 Ensayos de SIN-1

El radical peroxinitrito (ONOO^-) es uno de las especies reactivas que podemos encontrar en procesos inflamatorios biológicos. El método que se describe a continuación, desarrollado a partir de la bibliografía [20-22], permite evaluar la capacidad neutralizadora de radicales por parte de los materiales estudiados, en condiciones similares a las fisiológicas. Como precursor de este radical se usa SIN-1, que degrada espontáneamente a radical de oxígeno, anión superóxido y óxido nitroso, los cuales, reaccionan en el medio para formar ONOO^- . El ensayo se lleva a cabo en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF). La concentración de radicales se mide por fluorescencia usando *5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate* (DCFDAH $_2$)

que, incubado en medio básico, descompone en DCF. Cuando el DCF entra en contacto con el ONOO^- se obtiene un complejo fluorescente (**Fig. 2.4**)

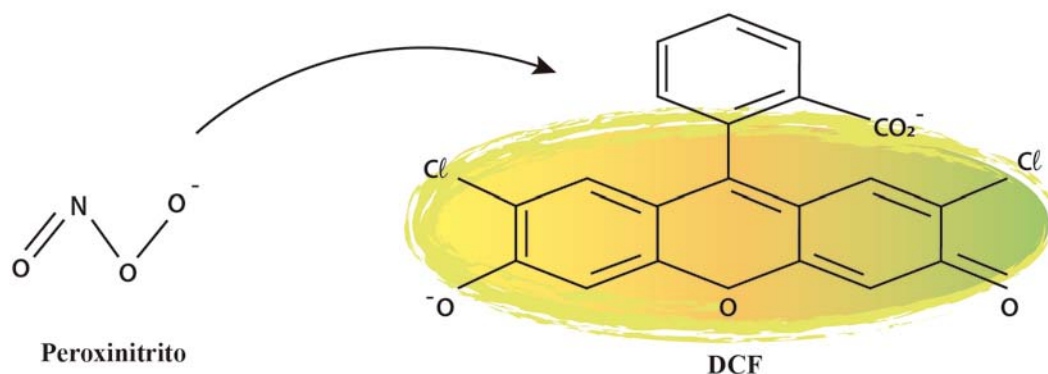


Fig. 2.4 El peroxinitrito reacciona con el DCF para formar un complejo fluorescente.

En primer lugar, se prepara la disolución de aCSF que tiene la siguiente composición: KCl 5Mm, NaCl 120mM, CaCl_2 1.4Mm, MgCl_2 1,2Mm, Dextrosa 5Mm, PBS 0.2mM.

Por otro lado, el SIN-1 (Sigma Aldrich # M5793), precursor del radical ONOO^- , se disuelve en PBS 1mM a una concentración 10mM, y esta disolución se diluye en el medio aCSF preparado hasta una concentración 25 μ M.

Por último, se prepara el DCF a partir de su precursor DCFDAH₂ (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, #C400). Para ello, se disuelve dicho precursor en PBS 1mM hasta una concentración 5Mm. Dicha disolución tiene que incubarse en oscuridad y sin agitación en medio KOH 0.1M, en una proporción 1:4 (precursor: medio básico). Finalmente, se diluye en aCSF hasta una concentración 50 μ M.

Para cada ensayo, se preparan 3 réplicas del denominado máximo. El máximo es la disolución 25 μ M de SIN-1 en aCSF que no se pone en contacto con ningún material. Para medirlo se toman alícuotas de 150 μ l de cada réplica y se le añaden 50 μ l de DCF, obteniendo el máximo de fluorescencia que se mediría en caso de que el material no eliminase radicales.

Para cada ensayo de cada material se realizan, tres replicas. Aproximadamente 50 mg del material en estudio (TiO_x) se incuban en oscuridad con 500 μl de SIN-1 25 μM en aCSF durante 30 min a 21° y 1200 rpm. Por otro lado, se realizan tres replicas del blancos de las medidas correspondientes a cada muestra. Para ello, se incuban en las mismas condiciones aproximadamente 50mg de muestra en 500 μl de aCSF. Tras la incubación de todos ellos, las suspensiones son centrifugadas a 20000 rcf (fuerza centrifuga relativa), a 21°C .

De los sobrenadantes se toman alícuotas de 150 μl que se colocan en una placa lectora de fluorescencia y sobre cada uno se añaden 50 μl de DCF. Finalmente, la fluorescencia se mide con un espectrofluorómetro Synergy Mx de Biotek.

Por lo tanto, la medida de la capacidad neutralizadora de los distintos materiales y la comparativa de las distintas actividades entre ellos se llevan a cabo de forma indirecta mediante la evaluación de la concentración de radical libre capaz de reaccionar con la DCF y por lo tanto generar fluorescencia.

2.4.2 Ensayos de DPPH·:

El DPPH· es un radical semiestable en condiciones normales de presión y temperatura. La disolución del radical absorbe en el rango de λ correspondiente al color morado ($\lambda \approx 400\text{nm}$). En presencia de agentes anti-oxidantes, este radical, es neutralizado pasando a DPPH₂, experimentando un cambio el color de la disolución, que comienza a absorber en el rango del amarillo ($\lambda \approx 600\text{nm}$) (**Fig. 2.5**). La concentración de DPPH· puede ser calculada a partir de la medida de absorbancia de Ultra Violeta-Visible (UV-Vis) a $\lambda = 517\text{ nm}$), previa realización de una recta de calibrado siguiendo la ley de Lambert-Beer. El DPPH· posee una cinética de reacción relativamente baja que permite determinar fácilmente la reactividad de los polvos. Este método de medida se ha desarrollado en el grupo en base a la bibliografía [23].

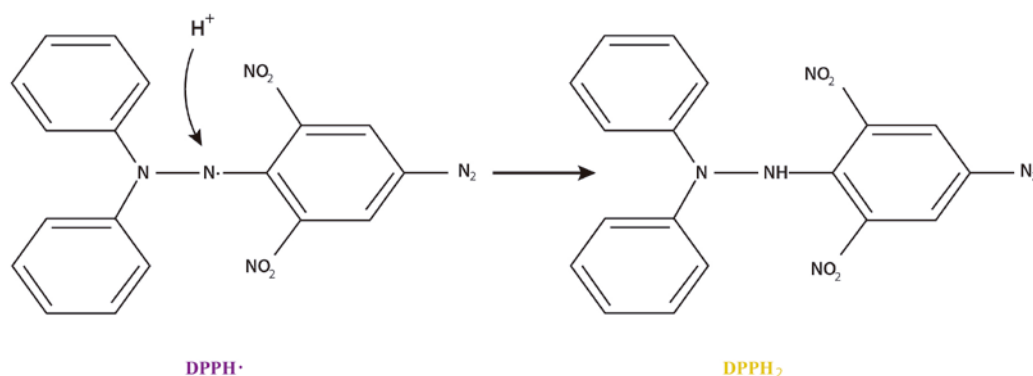


Fig.2.5 La molécula de DPPH· se caracteriza por absorber en el intervalo del morado.

Cuando se reduce su banda de absorción pasa al rango del amarillo (DPPH₂).

El primer paso es la calibración, que se realiza con diferentes concentraciones de DPPH· (Sigma #D9132) en 2-propanol (Sigma). Las concentraciones de los standards elegidas son 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mM. Y de entre ellas 0.1 mM es la elegida para llevar a cabo el experimento, por encontrarse en una zona intermedia de la recta que cumple la Ley de Lambert-Beer.

Para cada ensayo, se preparan 3 réplicas del máximo. El máximo en este caso es la disolución de 0.1mM de DPPH· en isopropanol sin ponerlo en contacto con ningún material. La medida en UV-Vis indicará la medida de absorbancia que se obtendría en el caso de que el material no hubiese eliminado radicales.

Para cada ensayo de cada material se realizan, tres réplicas. 50 mg del material a evaluar en polvo son incubados en 500µl de DPPH· 0.1mM en 2-propanol, en oscuridad a 21°C, a 1200rpm, durante 30 min. Por otro lado, se realizan tres réplicas de los blancos de las medidas correspondientes a cada muestra. Para ello, se incuban en las mismas condiciones 50mg de muestra en 500µl de isopropanol. Tras la incubación, las suspensiones se centrifugan a 20000 rcf a una temperatura de 21°.

Las medidas de absorbancia a $\lambda=517\text{nm}$ se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de UV- Vis Power Wave XS de BIOTEC.

Finalmente, la concentración de DPPH· que no ha sido eliminada se calcula a través de la pendiente obtenida de la recta de calibrado que cumple la Ley de Lambert-Beer. La concentración eliminada es la diferencia entre la concentración de DPPH· primitiva y la eliminada.

También se realizaron medidas de absorbancia de las disoluciones de DPPH·/Isopropanol puestas en contacto durante un periodo de incubación de 3 semanas (21 días) con los materiales en polvo de TiO_2 y Ti_5O_9 . Estos resultados complementan las conclusiones obtenidas de las medidas de *Band Gap* y el análisis por DRX de estos materiales tras el periodo de incubación, así como las de los ensayos electroquímicos realizados entre el material Ti_5O_9 y el medio DPPH·/Isopropanol. Tales medidas se realizaron con un espectrofotómetro UV-Vis-IRC Lambda 950, Perkin Elmer, USA.

2.5 Estudio eléctrico y electroquímico de electrodos de $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ y TiN

2.5.1 Medida de la conductividad en corriente continua (*Direct Current*, DC) por el método de las cuatro puntas.

El método de cuatro puntas es una técnica que tiene por objetivo eliminar los efectos de electrodo sobre la medida de la conductividad total [24], los cuatro electrodos, tanto los de potencial como los de corriente, son contactos puntuales. Se utiliza, generalmente, para medir materiales metálicos o aquellos que posean conductividades superiores a 1 Scm^{-1} . Es por ello que se hizo uso de este método de medida de la conductividad eléctrica para las muestras de $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ y TiN.

Para estas medidas se utilizaron discos densos de 8mm Ø en el caso del Ti_5O_9 y de 10 mm de Ø en el caso del TiN. Los discos densos son colocados sobre una base de alúmina, dejando que la superficie superior se ponga en contacto con las cuatro puntas de Pt. Dichos electrodos se conectan en continuo con una fuente de alimentación Agilent E3646A Dual Output DC Power Supply 0-8V, 3A/0-20V, 1.5A y un amperímetro FLUKE 89 IV TRUE RMS MULTIMETER. En paralelo, está conectado a un tensiómetro Agilent 34970A Data Acquisition/Switch Unit.

2.5.2 Medidas eléctricas en corriente alterna. Espectroscopía de Impedancia Compleja (EIC).

Esta técnica consiste en la aplicación de un potencial dependiente del tiempo de manera sinusoidal que se traduce en un flujo de corriente sinusoidal a través de la celda electroquímica. Ese estímulo eléctrico interactúa con un sólido de dos maneras fundamentales: a) causando la reorientación de los defectos con momentos eléctricos dipolares (normalmente defectos complejos) o b) provocando el movimiento de especies cargadas (defectos simples). Esta técnica permite obtener información en relación con el transporte de masa, la velocidad de las reacciones electroquímicas, la cinética de corrosión, las propiedades dieléctricas y el estudio de efectos microestructurales y de composición.

La impedancia eléctrica $Z(\omega)$ se define [25] como la razón entre la tensión sinusoidal aplicada, $U(\omega) = U_0 e^{i\omega t}$, y la corriente resultante, $I(\omega) = I_0 e^{i(\omega t + \theta)}$. $Z(\omega)$ es un número complejo que se puede representar en coordenadas polares, a través de su amplitud $|Z|$ y de su ángulo de fase θ , o en coordenadas cartesianas $Z(\omega) = Z' + iZ''$ en el plano de Argand, en donde Z' y Z'' son las partes real e imaginaria de la impedancia. Cuando la respuesta se representa en este plano de impedancias real e imaginaria, asume generalmente forma de arcos o semicírculos, y cada semicírculo está relacionado a un fenómeno diferente de comportamiento.

El tiempo de relajación correspondiente a cada arco satisface la relación $\omega_p \cdot \tau_p = 1$, donde ω es la frecuencia angular, τ el tiempo de relajación y el subíndice p corresponde al máximo del arco. Cuando los tiempos de relajación de los distintos fenómenos son semejantes, los arcos se solapan y surge la dificultad de interpretación.

Los resultados pueden ser analizados por dos vías: mediante modelos matemáticos exactos o a través de circuitos equivalentes. Los circuitos equivalentes han sido ampliamente utilizados por su simplicidad. No obstante, la ambigüedad de las interpretaciones de los datos experimentales surge [26] surge, normalmente, cuando el circuito contiene más de tres elementos. Estos pueden asociarse de varias maneras, dando lugar al mismo tipo de respuesta. Así, el circuito equivalente elegido tiene que

tener en cuenta otras informaciones relativas a los procesos físicos implicados, y debe ser siempre un reflejo de éstos.

La espectroscopía de impedancia en este trabajo se ha utilizado para estudiar la capacidad de almacenamiento de carga de los materiales propuestos como electrodo en electroestimulación (Ti_4O_7 - Ti_5O_9 y TiN) en medios que simulan a los fisiológicos. Para ello, se hicieron medidas de EIC en dos puntas, donde los materiales propuestos como electrodos para electroestimulación se usaron como electrodo de trabajo, y Pt como contra electrodo. Las medidas se han llevado a cabo en un rango de frecuencias de 2 Hz a 10^5 Hz recogidos con dos tipos de amplitud de onda 0.01 y 0.05 rms.

2.5.3 Voltametría cíclica

La voltametría cíclica es un método electroquímico que permite la detección e identificación de reacciones electroquímicas en la superficie de un electrodo de trabajo, aportando información sobre la reversibilidad de dichas reacciones, la superficie electroactiva del material en el electrodo y la estabilidad del mismo. La señal de entrada es un barrido de potencial a una velocidad constante impuesta en sentido directo e inverso, y por ello también se le conoce como barrido triangular de potencial. Dicho potencial eléctrico es aplicado a través del electrodo de trabajo, el cual, se encuentra sumergido en una disolución de una especie electroactiva. La señal de respuesta que se obtiene es una señal de intensidad de corriente que circula por dicho electrodo. Es importante observar que la señal de respuesta depende de la velocidad de barrido, de la geometría del electrodo y la rugosidad superficial del mismo.

En esta tesis se emplea la voltametría cíclica para evaluar la estabilidad electroquímica de los materiales propuestos como electrodo en medios que simulan a los fisiológicos y estudiar el mecanismo de neutralización de especies reactivas por parte de los óxidos reducidos de titanio.

2.5.3.1 Evaluación de la estabilidad electroquímica del $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ y TiN en el medio fisiológico.

La voltametría cíclica permitirá estudiar la estabilidad de los de los materiales $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ y TiN , como ya han realizado otros autores [27-29]. Estos materiales serán usados como electrodo de trabajo en la celda electroquímica planteada para el experimento. El material conformado como disco denso se conecta al equipo mediante un cable de cobre flexible de $1,5 \text{ mm}^2$ de sección, conexión que está aislada del electrolito por un tubo polimérico, y un conector aéreo macho tipo banana de 4mm de Ø (**Fig. 2.6**). Como es habitual en este tipo de celdas habrá un electrodo de referencia, en este caso Ag/AgCl , y un contra-electrodo que será una lámina de platino. Para testar la estabilidad del material en las condiciones en que se quiere trabajar, condiciones fisiológicas, los electrolitos de trabajo de la celda serán disoluciones en medio acuoso de tampón de fosfato salino (PBS) 0.01M, pH 7,4 a 25°C (Sigma-Aldrich P3813) o de NaCl a concentraciones fisiológicas (0.9 g/l) y medio de cultivo Neurbasal (Gibco, 21103).

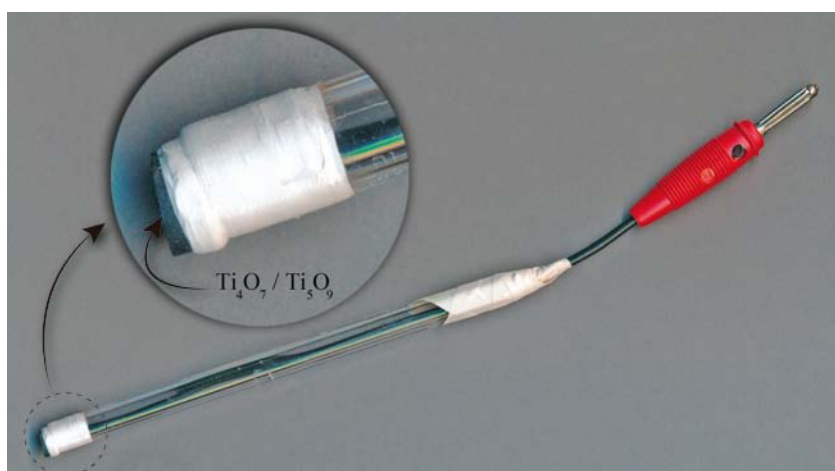


Fig. 2.6 Diseño de un electrodo de $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$

Para comprobar dicha estabilidad se registraron voltamogramas dentro de una ventana de potencial de entre -3 y 3 V para comprobar que no tienen lugar reacciones electroquímicas no deseadas en un amplio rango de potenciales y luego la ventana de potenciales se reduce siguiendo el protocolo indicado por la bibliografía para medir la

capacidad de almacenamiento de carga. Las velocidades de barrido de 10 y 20 mV/s, dejando un tiempo de estabilización de 5 s. De esta manera, se comprueba la amplitud de la ventana de potenciales que queda libre de que tengan lugar reacciones electroquímicas entre la superficie del material y el medio.

Además de observar la estabilidad del material, la voltametría muestra el tipo de mecanismo por el cual el material inyecta carga (en el medio o en el tejido) y permite hacer el cálculo de la capacidad de almacenamiento de carga del electrodo [30]. Dicha capacidad se calcula a partir del área encerrada entre la curva correspondiente a la corriente catódica, donde el material cede electrones, dividido por la velocidad de barrido, directamente relacionada con la intensidad de corriente y el área del electrodo, indicando la densidad de corriente que pasa a través de su sección.

En este estudio se sigue el protocolo presentado en la bibliografía [30], donde el barrido de potencial aplicado va desde -0,6 a 0,8 V, es decir, dentro de la ventana de potencial donde no se produce la electrólisis del agua. La velocidad de barrido que se ha aplicado es de 20mV/s y el tiempo de estabilización 5s.

Es necesario realizar varios barridos previos para la estabilización entre superficie del material y medio, que en el caso del $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ se alcanza en menos de 20 barridos a 20mV/s, pero en el TiN, sin embargo, se necesita hasta un total de 100 barridos a 100mV/s.

2.5.3.2 Estudio electroquímico del mecanismo de neutralización de especies radicales por parte de Ti_5O_9 y Ti_4O_7

Para estos ensayos se usarán los materiales de $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ como electrodos de trabajo y disoluciones del radical semi-estable DPPH· en concentración 3mM en isopropanol como medio de reacción. Debido a la descomposición que dicho radical sufre en presencia de luz, todas las medidas se llevaron a cabo en oscuridad. La voltametría cíclica ya ha sido empleada en otros trabajos para el estudio de radical DPPH· [31-34].

En el caso concreto de este trabajo se planteó una voltametría cíclica de tipo dinámica mediante el uso de un electrodo de trabajo rotatorio. El método del electrodo rotatorio permite un flujo del analito hacia el electrodo de trabajo durante el ensayo. Es una técnica muy utilizada para el estudio de mecanismos de reacción relacionados con la química redox.

Dicho electrodo rotatorio es de la casa Metrohm AUTOLAB RDE-2. Sobre la superficie de Pt del electrodo rotatorio, que actuará como electrodo de trabajo, se coloca un doble adhesivo de carbono conductor sobre cuya superficie, a su vez, se adhiere el material de $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ en polvo. Al igual que en otras voltametrías cíclicas realizadas en el conjunto de este trabajo doctoral, el electrodo de referencia utilizado es un electrodo de Ag/AgCl y el contra-electrodo una lámina de Pt. En cada ensayo se realizan hasta un total de 20 barridos entre -1,5 a 1,5 V a una velocidad de 20mV/s. El electrodo rotatorio gira con una velocidad de 1000rpm. El tiempo de estabilización antes de la medida también fue de 5s. Se realizaron blancos de las medidas en las mismas condiciones usando como electrodo de trabajo solo el electrodo rotatorio con su superficie de Pt o de éste con el adhesivo de carbono, y de todos los casos se trabajó con isopropanol como único medio.

También se comprobaron los resultados que se obtenían usando como electrodo de trabajo un electrodo fijo de $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ en disco denso, en un medio de DPPH· 3mM. Se realizaron hasta un total de 20 barridos a 20 mV/s en un intervalo de potencial de entre -1 y 1 V.

Todas las voltametrías cíclicas de este trabajo se realizaron con un potenciostato/galvanostato AUTOLAB ECO CHEMIE BV, PGSTAT 302N, provisto de un módulo para la realización de las medidas electroquímicas General Purpose Electrochemical System (GPES) para Windows versión 4.9.

2.5.4 Ruido electroquímico

El método del ruido electroquímico permite estudiar fluctuaciones de potencial y corriente instantáneas en función del tiempo [35], sin requerir de la aplicación de una señal de entrada capaz de promover reacciones que en condiciones normales no se producirían. Este método es comúnmente usado en corrosión [36, 37], sin embargo, puesto que es posible que el mecanismo de neutralización de especies radicales transcurra mediante reacciones de oxidación-reducción, en este trabajo de tesis se utiliza para relacionar los cambios de corriente y potencial que pudieran ser observados debido a reacciones que tengan lugar entre el material y la disolución de la especie radical DPPH.

Para este experimento la celda se compone de tres electrodos iguales, de $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$. Uno de los electrodos actúa como electrodo de trabajo (W_1), otro como electrodo de referencia (W_2) y el tercero como tierra, eliminando el ruido del entorno (**Fig. 2.7**).

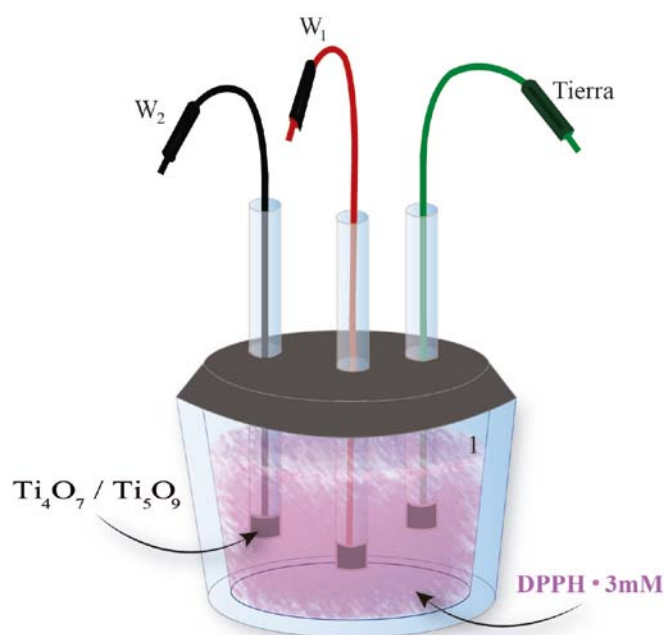


Fig. 2.7 Celda electroquímica para el ensayo de ruido electroquímico del material $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ en medio $\text{DPPH} \cdot 3\text{mM}$.

La medida tiene una duración total de 98400s (27.3h). La adquisición de datos durante los primeros 18000s (5h) se realiza en isopropanol, donde el electrodo se estabiliza con el medio de disolución. Tras este tiempo se añade DPPH· en el isopropanol hasta una concentración final de 3mM, registrando la evolución de potencial e intensidad en estas condiciones hasta el final del experimento (98400s). La totalidad del ensayo se realiza en oscuridad.

2.6 Aplicación de campo eléctrico (*electric field*, EF) en corriente continua (*direct current*, DC) sobre cultivos celulares

Los ensayos de aplicación de EF en DC sobre cultivos celulares se llevaron a cabo en colaboración con el Institute of Medical Sciences, en la universidad de Aberdeen, Escocia.

Dichos ensayos pretenden:

- ✓ Evaluación de la aplicación de EF en cultivos celulares sobre un cubre de vidrio como sustrato: Este ensayo permite, determinar si la estimulación eléctrica mediante la aplicación de campo eléctrico en corriente continua, promueve la orientación de los conos de crecimiento de las células neuronales y la direccionalidad de los axones, los cuales, giran para orientarse en la dirección y sentido del campo eléctrico aplicado. Para este ensayo se realizan cultivos celulares sobre cubres de vidrio como sustratos. En uno de ellos no se aplicará EF en DC y hará de control, en el otro se aplicará el EF en DC haciendo uso de los electrodos de Ag/AgCl de la manera en que se describe en el apartado 3.7.2.
- ✓ Evaluación de la aplicación de EF en cultivos celulares cultivados sobre sustrato de TiO₂: Permite realizar la misma evaluación que en el caso anterior pero en cultivos celulares neuronales sobre sustratos de TiO₂.
- ✓ Influencia del sustrato y la aplicación de campo eléctrico en la morfología de las células: Se trata de cuantificar propiedades de la morfología de las células (como el número de filopodia en axones y conos de crecimiento o el número de ramificaciones) en los distintos cultivos celulares y relacionar las diferencias que aquí se observan con las diferencias entre los sustratos y con el EF en el caso

de que se aplique. Con este objetivo, se realiza un conteo del número de filopodia en los axones y conos de crecimiento, del número de ramificaciones en los axones y se mide la longitud de los mismos, en cada una de las células de cada uno de los cultivos para obtener una estadística según el tipo de sustrato y condiciones de estimulación.

Evaluación de electrodos de $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ para estimulación eléctrica sobre cultivos celulares: En este caso lo que se evalúa es cómo afecta la aplicación de un EF en DC empleando electrodos de $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ a células neuronales cultivadas sobre sustratos cubres de vidrio como sustratos.

2.6.1 Cultivos celulares

Los cultivos primarios se realizan a partir de la extracción de tubos neurales de embriones *Xenopus* (ranas acuáticas del África Subsahariana) en su estado de desarrollo 20, cuando comienza la formación de la espina dorsal [38] de acuerdo con el método de Hinkle y col. (1981) [39], con las mínimas alteraciones posibles. Se trató de minimizar la variabilidad de cámara a cámara, sumergiendo los tubos neurales en una única solución de Steinberg libre de Ca^{2+} – Mg^{2+} que sirvió como medio de disgregación. Después el medio de disgregación es reemplazado por medio de cultivo (200 ml). La suspensión celular resultante es agitada con ayuda de micropipeta. El medio de cultivo consta de (v/v) 20% medio Leibowitz L15 1X (MP-Biomedicals #1251054), 2% penicilina (5000 IU/ml)/streptomicina (5000 mg/ml), 1% serum fetal bovino (todos de ICN Biomedicals) disueltos en disolución de Steinberg (58 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.44 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.3 mM MgSO_4 , 4.6 mM Tris–HCl, pH 7.9).

Para los cultivos realizados sobre cubres de vidrio las células suspendidas en el medio de cultivo son depositadas en la hendidura definida por dos tiras de cobre de vidrio situadas en el fondo de la cámara. Un tercer cobre de vidrio (22 x 22 mm) se coloca en la parte superior, sostenido por los soportes colocados paralelamente. Se usa una silicona compatible con las células para sellar los dos cultivos que se realizan en paralelo dentro de una misma cámara (Dow Corning MS4). Antes de comenzar a aplicar el EF es necesario esperar 1h tras depositar las células, de manera que comience el desarrollo y la adherencia de las mismas pero no la ramificación y crecimiento de las neuritas.

En el caso de los cultivos realizados sobre sustratos de TiO_2 la suspensión celular en el medio de cultivo se deposita en la superficie del material y se coloca sobre ella un cubre de vidrio (22 x 22 mm) situado en la parte superior. Tras el tiempo de cultivo (1h después del depósito de las células) este *cubre* se levanta por inundación y flotación en el medio de cultivo. La superficie cultivada del material de TiO_2 se coloca boca abajo soportada en sus extremos por las tiras de *cover slip* colocadas en paralelo sobre el fondo de la cámara, quedando situadas las células en la zona de hendidura. Se añade medio de cultivo para rellenar el hueco que queda entre la superficie cultivada y el fondo de la cámara.

2.6.2 Aplicación de EF

Los requisitos principales en la aplicación de EFs a células *in vitro* se han descrito previamente [40]. La cámara es una placa de petri para cultivos celulares (FALCON 3003) cuyas dimensiones son de 100 mm de diámetro por 20 mm de alto. Se colocan tres tiras *cover slip* 12 x 64-mm en paralelo, dejando una separación de 1cm entre ellas. Dichas tiras se adhieren al fondo de la cámara con silicona (Dow Corning 3140RTV). Las cámaras no se usan inmediatamente tras su preparación sino que se dejan reposar 24 h para permitir el perfecto sellado de la silicona.

Los contactos eléctricos con las cámaras de cultivo se realizan a través de puentes con forma de U de 20 cm de rellenos con un gel de Agar al 1% en disolución de Steinberg. Uno de los extremos del puente se encuentra sumergido en una solución Steinberg junto con un electrodo de Ag/AgCl. Dicho electrodo se conecta a una fuente de alimentación en DC. El otro extremo del puente conecta con la piscina de medio de cultivo donde se encuentran las células cultivadas sobre la superficie de cubre de vidrio o sustrato de TiO_2 (**Fig. 2.8**). El EF aplicado es de 150 mV/mm de longitud del sustrato durante 3 h. Este EF se optimizó para cultivos celulares realizados sobre cubres de vidrio y se utilizó el mismo para los cultivos celulares realizados sobre TiO_2 .

Cuando el EF es aplicado con electrodos de $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$, éstos se colocan directamente sobre el medio. En estos ensayos la conexión no se realiza a través de puentes de Agar como en el caso anterior. Los electrodos de trabajo conectados a la fuente de alimentación de corriente eléctrica en DC se sitúan en extremos opuestos de

del cubres de vidrio sobre el que se cultivan las células. Uno trabaja como cátodo y el otro como ánodo (**Fig. 2.9**).

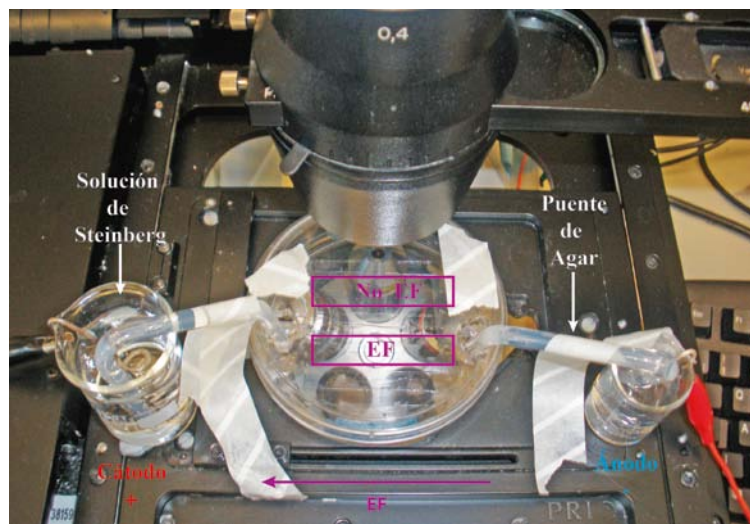


Fig. 2.8 Montaje para ensayos de aplicación de EF en DC en cultivos celulares neuronales *Xenopus* sobre cubres de vidrio. La observación de los cultivos celulares se lleva a cabo con un microscopio de contraste. El EF es aplicado mediante electrodos Ag/AgCl sumergidos en una disolución de Steinberg conectados con el cultivo celular a través de puentes de agar.

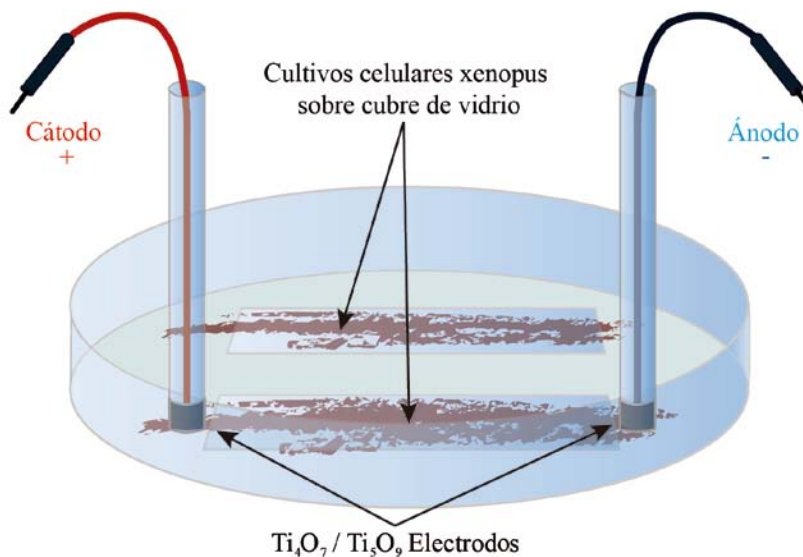


Fig. 2.9 Montaje de ensayos de aplicación de EF en DC en cultivos celulares neuronales *Xenopus* sobre cubres de vidrio. La observación de los cultivos celulares se lleva a cabo con un microscopio de contraste. El EF es aplicado mediante electrodos Ti_4O_7/Ti_5O_9 .

2.6.3 Obtención de Datos

2.6.3.1 Microscopio de contraste

Los datos de las células cultivadas en cubres de vidrio se recogen como micrografías tomadas con un microscopio de contraste Axiovert 25 Zeiss, provisto de un software Metamorph, que permite la obtención de las fotografías de dichas células (**Fig. 2.10**). Con el microscopio se realiza un mapeo de los substratos tomando las coordenadas de todas las células neuronales para fotografiarlas a diferentes tiempos 0, 1, 2 y 3 horas.

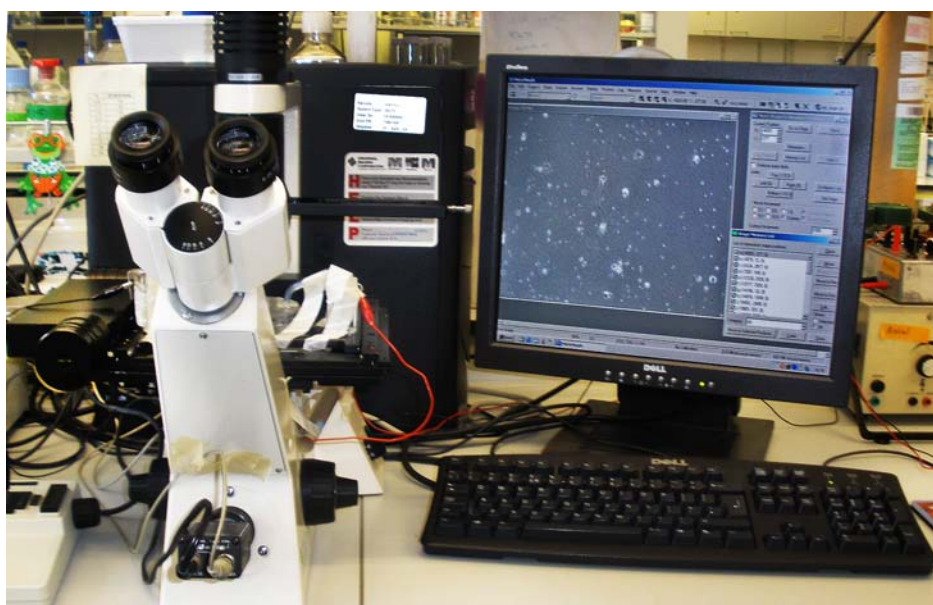


Fig. 2.10 Ensayo en curso de aplicación de EF en DC sobre cultivos celulares neuronales *Xenopus* observado en microscopio Axiovert 25 de ZEISS, provisto de un software Metamorph.

En estos ensayos se miden las longitudes y el ángulo que ha girado cada neurita de cada célula neuronal a los distintos tiempos [41]. Se realiza un estudio estadístico de los ángulos girados con el objetivo de conocer los porcentajes de neuritas que giran hacia cátodo, el ánodo o que no giran y la dirección final hacia la que apuntan sus conos de crecimiento. Se considera que las neuritas han variado su dirección cuando su ángulo de giro es mayor a 15° . La medida de los ángulos de girado se realiza sobre el plano de la **Fig. 2.11**, situando el cuerpo de la neurona en el punto (0,0).

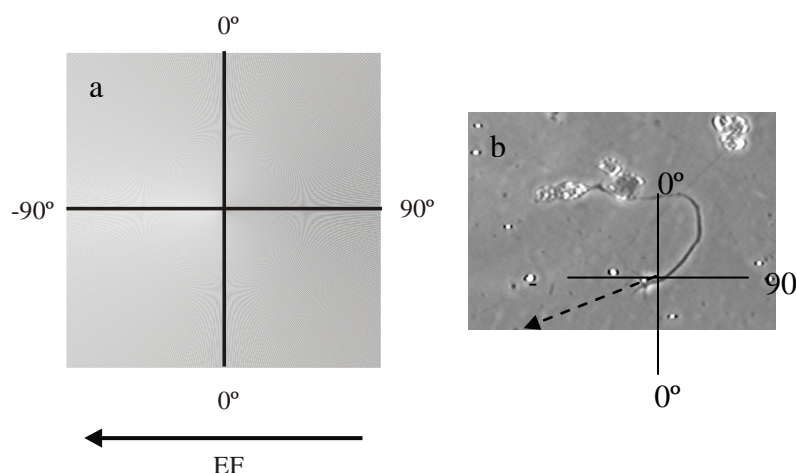


Fig. 2.11 (a) Plano usado para la medida de ángulos girados por los conos de crecimiento de las neuritas. -90° significa dirección catódica, 90° significa dirección anódica y 0° significa dirección perpendicular a la dirección del EF. (b) Ejemplo del cálculo del ángulo de giro en una de las imágenes captadas sobre un cubre de vidrio.

2.6.3.2 Microscopio de Fluorescencia

Debido a las propiedades ópticas del material TiO_2 , que es opaco, se varía el protocolo para estudiar la evolución de las células cultivadas sobre este tipo de superficies. Al igual que en el caso de las células cultivadas sobre el cubre de vidrio, se aplican las 3 horas de estimulación. En este caso, una vez finalizada la estimulación las células se fijan con una solución de Formaldeído al 4% en PBS (1 pastilla Sigma disuelta en 200 ml de agua MILI-Q) y un 0.1% detergente, Tween-20 (PBST). La tinción de las mismas se realiza con Rhodamine Phalloidine. Finalmente sobre la superficie cultivada se coloca un cubre de vidrio y se añaden unas gotas de Vectashield para prevenir el fotoblanqueado.

Esta vez las micrografías se toman con un microscopio de fluorescencia Axio Cam MRm from ZEISS. Se lleva a cabo la comparación de las micrografías de las células neuronales cultivadas sobre cubres de vidrio y TiO_2 con y sin aplicación de EF, La respuesta de direccionalidad se expresa cualitativamente por superposición de los cuerpos celulares y trazando los caminos seguidos por las neuritas [41] obteniendo al final unos diagramas conocidos con el nombre de “diagramas araña”. Estos permiten, de manera clara, una identificación visual de la dirección seguida por las neuritas.

Bibliografía

1. Matei, C., D. Berger, S. Stoleriu, D. Neagu and E. Stefan, *Synthesis of ceria-based ceramics by combustion technique*. Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 2010. **12**(7): p. 1524-1529.
2. Dong, Y., S. Hampshire, J.E. Zhou, X. Dong, B. Lin and G. Meng, *Combustion synthesis and characterization of Cu-Sm co-doped CeO₂ electrolytes*. Journal of the European Ceramic Society, 2011. **31**(13): p. 2365-2376.
3. Merzhanov, A.G., *Combustion processes that synthesize materials*. Journal of Materials Processing Technology, 1996. **56**(1-4): p. 222-241.
4. Moreno, B., *Síntesis por combustión de catalizadores metálicos y metal cerámicos para su aplicación en pilas de combustible de membrana de intercambio protónico*. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid, 2006.
5. Chinarro, E., *Síntesis y caracterización de materiales cerámicos y/o metálicos y desarrollo de ensamblajes electrodo-membrana para aplicaciones electroquímicas y electrocatalíticas*. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid, 2003.
6. Carballo-Vila, M., B. Moreno-Burriel, E. Chinarro, J.R. Jurado, N. Casañ-Pastor and J.E. Collazos-Castro, *Titanium oxide as substrate for neural cell growth*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2009. **90**(1): p. 94-105.
7. Silva, E.A., E.S. Kim, J.K. Hyun and D.J. Mooney, *Material-based deployment enhances efficacy of endothelial progenitor cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(38): p. 14347-14352.
8. Eick, B.M. and J.P. Youngblood, *Carbothermal reduction of metal-oxide powders by synthetic pitch to carbide and nitride ceramics*. Journal of Materials Science, 2009. **44**(5): p. 1159-1171.
9. Chen, G.Z., D.J. Fray and T.W. Farthing, *Direct electrochemical reduction of titanium dioxide to titanium in molten calcium chloride*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 361-364.
10. Veljković, I., D. Poleti, M. Zdujić, L. Karanović and Č. Jovalekić, *Mechanochemical synthesis of nanocrystalline titanium monoxide*. Materials Letters, 2008. **62**(17-18): p. 2769-2771.
11. Hauf, C., R. Kniep and G. Pfaff, *Preparation of various titanium suboxide powders by reduction of TiO₂ with silicon*. Journal of Materials Science, 1999. **34**(6): p. 1287-1292.
12. Hayfield, P.C.S., *Development of a New Material Monolithic Ti₄O₇ EBONEX[®] Ceramic*. Royal Society of Chemistry, 2002 **Chapter 2**: p. 9-46.
13. Wexler, D., D. Parker, V. Palm and A. Calka, *Mechano-synthesis and compaction of titanium-titanium nitride composites*. Materials Science and Engineering A, 2004. **375-377**(1-2 SPEC. ISS.): p. 905-910.
14. Dutrey, L., E.L. De Heras, H.G. Svoboda and P.A. Corengia, *Mechanical properties of layers obtained by DC-pulsed plasma nitriding on a low-alloy steel (AISI 4140)*. Plasma Processes and Polymers, 2009. **6**(SUPPL. 1): p. S314-S320.
15. S. Brunauer, P.H.E., E. Teller, *Adsorption of gases in multimolecular layers*. J. Am. Chem c, 1938. **60**: p. 309-19.

16. Zachariah, A., K.V. Baiju, S. Shukla, K.S. Deepa, J. James and K.G.K. Warner, *Synergistic effect in photocatalysis as observed for mixed-phase nanocrystalline titania processed via sol-gel solvent mixing and calcination*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(30): p. 11345-11356.
17. Ponce, S.P., *Catalizadores del tipo perovskita para la oxidación del CO y gas natural*. Tesis Doctoral ICP-CSIC Unoversidad Autónoma de Madrid, 1999.
18. Van Leeuwen, R.A., C.J. Hung, D.R. Kammler and J.A. Switzer, *Optical and electronic transport properties of electrodeposited thallium(III) oxide films*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(41): p. 15247-15252.
19. Zanchetta, P. and J. Guezennec, *Surface thermodynamics of osteoblasts: Relation between hydrophobicity and bone active biomaterials*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001. **22**(4): p. 301-307.
20. Contreras, R., H. Sahlin and J.A. Frangos, *Titanate biomaterials with enhanced antiinflammatory properties*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2007. **80**(2): p. 480-485.
21. Suzuki, R., J. Muyco, J. McKittrick and J.A. Frangos, *Reactive oxygen species inhibited by titanium oxide coatings*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2003. **66**(2): p. 396-402.
22. Sahlin, H., R. Contreras, D.F. Gaskill, L.M. Bjursten and J.A. Frangos, *Anti-inflammatory properties of micropatterned titanium coatings*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2006. **77**(1): p. 43-49.
23. Molyneux, P., *The use a stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for stimating antioxidant activity*. Songklanakarin J. Sci. Technol, 2004. **26**: p. 211-219.
24. Blythe, A.R., *Cambridge Solid State Science Series*. Ed. A.R. Blythe, 1980. **137**.
25. Figueiredo, F.M.H.L.R., *Potencialidades de cátodos compósitos à base de LaCoO₃+ZrO₂*. Tesis Doctoral por la Universidad de Aveiro, Portugal, 1999.
26. Hirose, N. and A.R. West, *Impedance spectroscopy of undoped BaTiO₃ ceramics*. J. Am. Ceram. Soc. J. Am. Ceram. Soc., 1996. **79** ((6)): p. 1633-41.
27. Walsh, F.C. and R.G.A. Wills, *The continuing development of Magnéli phase titanium sub-oxides and Ebonex® electrodes*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(22): p. 6342-6351.
28. Pollock, R.J., *electrochemical properties of a new electrode material, Ti₄O₇*. Mat. Res. Bull., 1984. **Vol. 19**: p. pp. 17-24.
29. Smith, J.R., F.C. Walsh and R.L. Clarke, *Electrodes based on Magnéli phase titanium oxides: The properties and applications of Ebonex® materials*. Journal of Applied Electrochemistry, 1998. **28**(10): p. 1021-1033.
30. Cogan, S.F., *Neural stimulation and recording electrodes*. 2008. p. 275-309.
31. Milardovic, S., D. Iveković, V. Rumenjak and B.S. Grabarić, *Use of DPPH•/DPPH redox couple for biamperometric determination of antioxidant activity*. Electroanalysis, 2005. **17**(20): p. 1847-1853.
32. Zhuang, Q.K., F. Scholz and F. Pragst, *The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles*. Electrochemistry Communications, 1999. **1**(9): p. 406-410.
33. Gomes, A., E. Fernandes, M.B.Q. Garcia, A.M.S. Silva, D.C.G.A. Pinto, C.M.M. Santos, J.A.S. Cavaleiro and J.L.F.C. Lima, *Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones: Relationship with the antioxidant activity*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2008. **16**(17): p. 7939-7943.

34. Milardović, S., D. Iveković and B.S. Grabarić, *A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical*. Bioelectrochemistry, 2006. **68**(2): p. 175-180.
35. Robert Cottis, S.T., *Electrochemical Impedance and Noise*. 1999.
36. Doherty, P.E., M.J. Psaila-Dombrowski, S.L. Harper and W.G. Schneider, *The use of electrochemical noise measurement in the evaluation of materials for steam generators*. ASTM Special Technical Publication, 1996. **1277**: p. 288-304.
37. Rosero-Navarro, N.C., M. Curioni, R. Bingham, A. Durán, M. Aparicio, R.A. Cottis and G.E. Thompson, *Electrochemical techniques for practical evaluation of corrosion inhibitor effectiveness. Performance of cerium nitrate as corrosion inhibitor for AA2024T3 alloy*. Corrosion Science, 2010. **52**(10): p. 3356-3366.
38. Faber, P.D.N.a.J., *Normal table of Xenopus laevis (Daudin). : A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis*. 1956.
39. Hinkle, L., C.D. McCaig and K.R. Robinson, *The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field*. Journal of Physiology, 1981. **Vol. 314**: p. 121-135.
40. McCaig, C.D., D.W. Allan, L. Erskine, A.M. Rajniecek and R. Stewart, *Growing Nerves in an Electric Field*. Neuroprotocols, 1994. **4**(2): p. 134-141.
41. Rajniecek, A.M., K.R. Robinson and C.D. McCaig, *The direction of neurite growth in a weak DC electric field depends on the substratum: Contributions of adhesivity and net surface charge*. Developmental Biology, 1998. **203**(2): p. 412-423.

Capítulo III

III Síntesis, procesamiento y caracterización de materiales basados en óxidos de titanio

3.1 Introducción

Los materiales que se han desarrollado y caracterizado en este trabajo de investigación con el objetivo, a largo plazo, de ser usados como implantes para regeneración tisular en el sistema nervioso central (SNC) son: TiO_2 , CeO_2 , Ti_4O_7 , Ti_5O_9 y TiN .

En este trabajo se han desarrollado materiales con dos funcionalidades diferentes: materiales de sustrato, para la adhesión, supervivencia y crecimiento neuronal; y materiales de electrodo, susceptibles de ser empleados como electrodo de estimulación en el SNC.

De esta manera, los materiales de TiO_2 y CeO_2 se conformaron para su aplicación como sustrato. Dichos materiales se sintetizaron como polvos, de los que se llevará a cabo la caracterización de sus propiedades físicas y químicas, además se

realizó un estudio encaminado a la determinación de la capacidad neutralizadora de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS). Esta caracterización está dirigida a relacionar dicha capacidad de neutralización con las propiedades del material desde el punto de vista de su interacción con las células. Por otro lado, también se caracterizarán química y físicamente las superficies de los materiales densos, conformados a partir de los polvos, para establecer la influencia de las mismas en la adhesión supervivencia y crecimiento de las células cultivadas sobre ellos.

Por otro lado, los materiales de Ti_4O_7 , Ti_5O_9 y TiN se plantean como materiales para electrodo. Dichos materiales se obtienen por tratamiento térmico del TiO_2 sintetizado, tanto en forma de polvo como conformado en discos densos, en atmósferas de N_2/H_2 (90:10) y NH_3 , respectivamente. Ambos materiales también se caracterizan, enfocando el estudio de sus propiedades físicas y químicas a su uso como electrodo en electroestimulación médica. Además el Ti_4O_7 y Ti_5O_9 se incluye en el estudio de la capacidad neutralizadora de ROS y RNS para evaluar la importancia del estado de oxidación del Ti en el mecanismo de dicha neutralización.

El primer paso para la obtención de la mayor parte de los materiales que se presentan en este trabajo comienza con la síntesis de TiO_2 , que se prepara mediante el método sol-gel y una posterior precipitación.

3.2 Síntesis y procesamiento cerámico de TiO_2

La síntesis de los polvos cerámicos de TiO_2 se lleva a cabo mediante la disolución del precursor. Para ello, se hace reaccionar Isopropóxido de Titanio (IV) (Aldrich, 97%) en Etanol Absoluto (Panreac) durante 24 horas a 60°C , en un sistema con reflujo. A continuación la disolución contenida en el matraz se vuelca en una bandeja a temperatura ambiente, de manera que el TiO_2 precipita en forma de polvo blanco como consecuencia de la reacción de hidrólisis generada al exponerlo a la humedad ambiental. Los polvos obtenidos se tamizan en una malla con luz de $100\ \mu\text{m}$. Este TiO_2 en polvo se denomina TiO_2 recién preparado (Fig. 3.1) [1]. Este material ha sido estudiado, pero en general, se ha utilizado como compuesto de partida para la obtención de los demás materiales usados en este trabajo. De esta manera, los polvos recién preparados son sometidos a distintos tratamientos térmicos de calcinación, con el objeto de eliminar residuos orgánicos, conseguir diferentes fases, modificar la

proporción en la mezcla de dichas fases y las características morfológicas del material. Así, los polvos de TiO_2 recién preparados fueron calcinados en aire durante 12h a 100°C, 200°C, 300°C, 400°C, 500°C, 600°C, 650°C, 700°C y 750°C.

Se elige como material para realizar los estudios de biocompatibilidad y como material de partida para el conformado final de las muestras densas, el obtenido tras el tratamiento de calcinación 600°C durante 12h en aire (**Fig. 3.1**). La elección de este tratamiento térmico se realiza en base a los resultados obtenidos principalmente del estudio por DRX de las distintas calcinaciones de los polvos de TiO_2 recién preparados; y teniendo en cuenta que según el resultado obtenido del análisis térmico de dichos polvos (ATD-TG), a 400°C los compuestos orgánicos se volatilizan, sin embargo, en las calcinaciones llevadas a cabo a esta temperatura, los residuos de carbono son evidentes, incluso a simple vista y no se eliminan totalmente hasta 600°C.

Una vez que los polvos han sido calcinados, se les somete a un proceso de molienda para disminuir los aglomerados. Para ello se introduce el polvo calcinado a 600°C/12 horas en un molino de atrición durante 5h en etanol, empleando bolas de Ceria de 1 mm de diámetro en proporciones de masa 3:1 (bolas:polvos). Finalizado este tratamiento, se vuelven a tamizar los polvos en malla de luz de 100 μm . A los polvos obtenidos tras este procesamiento los denominamos *polvos calcinados*.

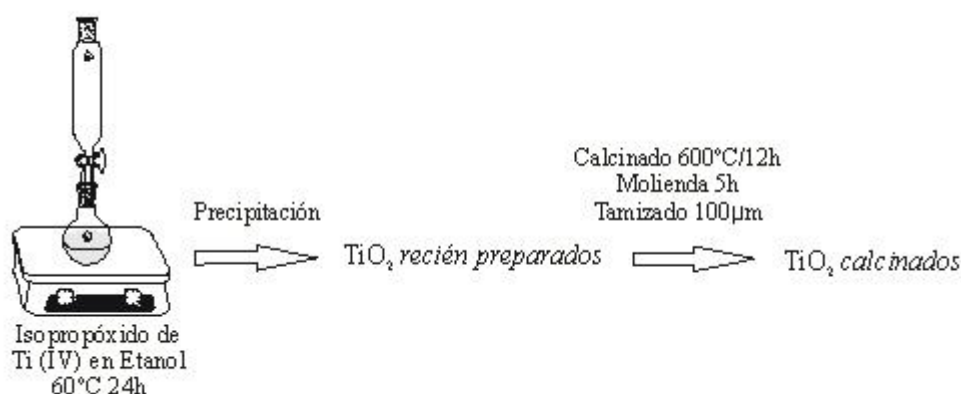


Fig 3.1 Síntesis del polvo de TiO_2 recién preparado y posterior procesamiento cerámico para la obtención de los polvos *calcinados* de TiO_2 .

3.2.1 Obtención de polvos de TiO_2 calcinados a diferentes temperaturas

En este trabajo doctoral se ha estudiado la influencia de la composición en fases (anatasa/rutilo) de la muestra de TiO_2 y de la cristalinidad de los polvos en las propiedades de los mismos, por ejemplo, en el valor del intervalo de energías prohibidas o *Band Gap* [2] y peso que tiene en el mecanismo de neutralización de radicales.

Según la bibliografía, en una muestra de TiO_2 depositada sobre muscovita y sometida a tratamientos térmicos a diferentes temperaturas hasta 1000°C , se puede observar cómo el TiO_2 , como fase anatasa amorfa, comienza a aumentar la cristalinidad de dichas fase con la temperatura de calcinación. Pasado un límite de temperatura, 800°C , la energía térmica aplicada comienza a ser invertida en la formación de fase rutilo, cuyo porcentaje aumenta con la temperatura de calcinación. De manera que, entre 800°C y 1000°C , existe un mezcla de fases, anatasa/rutilo, hasta llegar a que sólo exista TiO_2 en fase rutilo, [3]. También es cierto que las temperaturas de transformación de fase, así como, la composición de fases pueden variar si se dopa con diferentes iones metálicos. Esta influencia del dopado en la temperatura de transformación de fases depende del grado de sustitución de Ti^{4+} por los iones metálicos[3].

Por este motivo, en este trabajo se ha realizado un estudio de calcinación semejante, utilizando la DRX como herramienta para establecer los límites de temperatura a los que se producen cambios de fase en material de TiO_2 obtenido en la síntesis de sol-gel/precipitación. Se realizó el estudio de las siguientes temperaturas de calcinación: 200°C , 400°C , 600°C , 650°C , 700°C y 750°C , durante 12h en aire. Tras los resultados obtenidos que se muestran en las **Fig. 3.6** y **3.7**. Los polvos *recién preparados* que se calcinaron a 600°C , 650°C , 700°C y 750°C , se sometieron a una molienda en molino de atrición durante 5h y se tamizaron a través de una luz de malla de $100\ \mu\text{m}$. Estos polvos de TiO_2 están compuestos de diferentes porcentajes rutilo/anatasa. Sin embargo, en el caso de los polvos que se obtuvieron calcinando a 200°C y 400°C , el TiO_2 se encuentra en fase anatasa pura, pero las muestras presentan diferente cristalinidad.

3.2.2 Preparación de muestras densas de TiO_2

Las muestras densas de TiO_2 se plantearon como substratos bidimensionales sobre los que realizar ensayos con cultivos celulares neuronales [1].

Para la obtención de estas muestras se parte de los *polvos calcinados* de TiO_2 , los cuales, introducidos en una funda polimérica SILICONLATEX® de RÜSCH, se compactan mediante presión isostática a 200 MPa durante 1min. La muestra compactada tiene el aspecto de un monolito cilíndrico con las siguientes dimensiones: 2cm de diámetro x 5cm de longitud en el caso de las muestras para cultivos celulares sobre los que se aplica campo eléctrico, y 1cm de diámetro x 5cm de longitud para muestras que tras el tratamiento correspondiente serán usadas como electrodos. Una vez prensada se introduce en un horno y se somete a un tratamiento térmico de sinterización, a 1400°C durante 4 horas en aire. La selección de la rampa de sinterización se realizó en base a los análisis dilatométricos de los polvos de partida, siendo de 5°C/min tanto en la etapa de subida como en la de enfriamiento.

Una vez sinterizada, la muestra de geometría cilíndrica obtenida, se corta en discos con distinto espesor en una micro-cortadora (**Tabla 3.1**). Así, para muestras usadas en cultivos celulares se cortan discos con 1.5 mm de espesor y, para la fabricación de electrodos de Ti_4O_7 y Ti_5O_9 , discos de 3mm de espesor. En el caso concreto de los discos densos de TiO_2 destinados a la obtención de cultivos celulares sobre los que, posteriormente, se aplica un campo eléctrico, fueron necesarios diámetros de disco de 20 mm de diámetro. En este caso, se prensaron cilindros de mayor diámetro que tras su sinterizado y corte mostraron una baja densidad en el interior de la muestra, este hecho indicó que el proceso de densificación no había finalizado del todo, probablemente como consecuencia del gradiente térmico existente en el interior de la muestra durante la sinterización. Por ello, se sometió a los discos, ya cortados, a una segunda rampa de sinterización a 1400°C/4h, para completar el proceso de densificación en la zona central de los mismos.

Tabla 3.1. Dimensiones de los distintos tipos de discos según su posterior uso

Muestras de TiO ₂		Destino y Utilidad
Diámetro (mm)	Espesor (mm)	
8-10	1.5	Cultivos celulares
8-10	3.0	Reducir para obtención de electrodos
20	1.5	Cultivos celulares + campo eléctrico

3.2.3 Conformado y obtención de sustratos tridimensionales, tubos y esponjas de TiO₂

Se ha llevado a cabo el procesamiento cerámico de los polvos de TiO₂ con el objetivo de obtener un sustrato 3-D con unos requerimientos dimensionales específicos. Así, se estudió la posibilidad de obtener tanto, tubos (*conduits*) con un canal central de diámetro inferior a ≤ 2 mm, y arquitecturas porosas con una distribución de tamaño de poro interconectado de 500 μm .

Basado en el procesamiento llevado a cabo por otros autores [4] y en el uso de plantillas o “*templates*”, para obtener sustratos tridimensionales cerámicos, con macro y microporosidad, se desarrolla el siguiente procedimiento para la preparación de esponjas y tubos de TiO₂. En primer lugar, se prepara una suspensión de TiO₂, compuesta de un 70% en peso de TiO₂ comercial (Merck, $\geq 99\%$), 30% en peso de agua, 1% de defloculante Dolapix CE 64 (Zschimer and Schuwarz Group) y 3% de ligante Optapix PAF 35 (Zschimer and Schuwarz Group). Se comprobó la estabilidad de dicha suspensión mediante la obtención de su curva de viscosidad (**Fig. 3.2**). Comprobando cómo a partir de pH 7 la fuerza de cizalla se hace estable, lo que indica que la viscosidad de una suspensión de este material en polvo permanecerá constante para pH ≥ 7 .

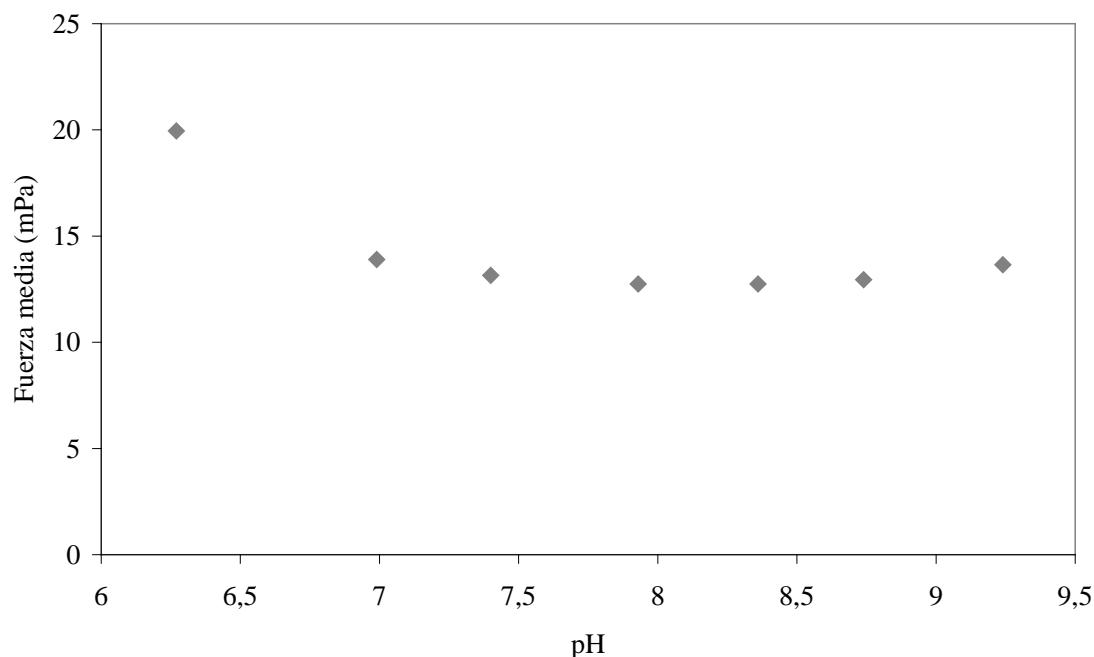


Fig. 3.2 Curva de viscosidad de la suspensión de TiO_2 comercial vs. pH.

En ella se sumergen diferentes polímeros, no termo-estables en cuya composición no existan compuestos inorgánicos que tras una descomposición térmica dejen residuos. Una vez que los polímeros con formas de esponja y cilíndricos (**Fig 3.3**), han sido sumergidos durante un tiempo inferior a un minuto en la suspensión y extraídos, se dejan secar primero al aire y después en una estufa a 60°C durante unos 5 a 10 minutos. Finalmente, se someten a un tratamiento térmico, en aire, que consta de varios pasos. En el primero la temperatura asciende a $2^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 800°C , de manera que se permite la descomposición del polímero, el segundo, en que la temperatura asciende a $5^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 1400°C donde se mantiene 2 horas, temperatura a la que el material cerámico sinteriza [4]; y el último la rampa de enfriamiento a $5^\circ\text{C}/\text{min}$.

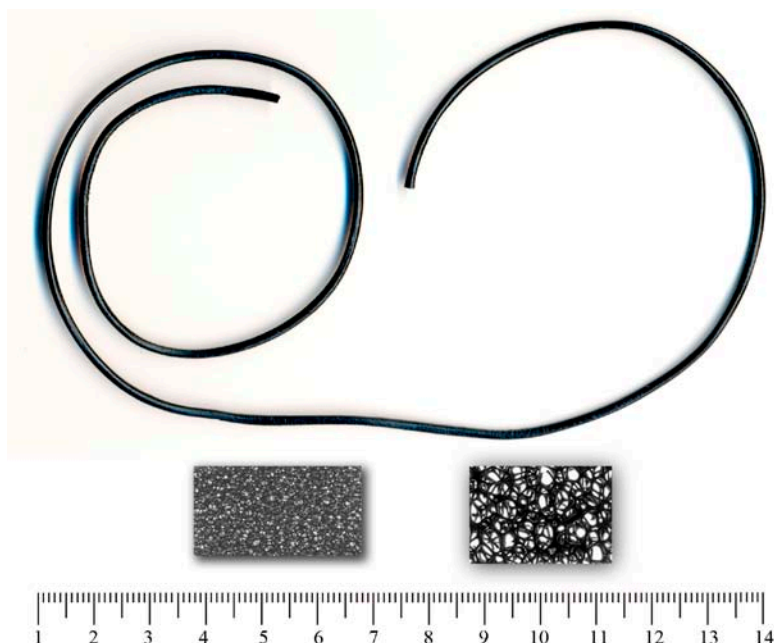


Fig. 3.3 Imágenes de polímeros usados como plantillas o *templates* para la obtención de estructuras cerámicas tridimensionales. A la izquierda, esponjas, con dos tamaños de porosidad diferentes, y a la derecha hilo.

3.2.4 Obtención de fases de Magnéli en polvos, muestras densas y substratos tridimensionales mediante procesamiento cerámico a partir de TiO_2 .

La obtención de las fases de Magnéli, se lleva a cabo mediante el tratamiento de TiO_2 en atmósfera reductora, a temperaturas superiores a 1000°C [5]. Se han propuesto otros métodos para la obtención de fases de Magnéli, como son la reducción electroquímica, mecanoquímica y carbotermal, pero el procedimiento por el cual se fabrican, industrializan y comercializan estos materiales es el anteriormente explicado [6-9]. Algunos de estos procesos, usados en el intento de obtener fases de Magnéli, se resumen en la **Tabla 3.2**, así como las fases encontradas en su estudio por DRX.

Tabla 3.2. Resumen de métodos empleados para la obtención de fases de TiO_2 reducidas, así como las fases obtenidas según su estudio por DRX.

Método	Condiciones	DRX
Mecanoquímico [8]	$\text{TiO}_2 + \text{Ti metálico: W8mm}\varnothing + \text{Al}_2\text{O}_3 4\text{mm}\varnothing^* (1\text{h})$	Anatasa +Ti metálico
	$\text{TiO}_2 + \text{Ti metálico: Al}_2\text{O}_3 4\text{mm}\varnothing + \text{Al}_2\text{O}_3 1\text{mm}\varnothing^* (2\text{h})$	Anatasa +Ti metálico
	$\text{TiO}_2 + \text{Ti metálico: Al}_2\text{O}_3 1\text{mm}\varnothing^* (2\text{h})$	Anatasa +Ti metálico
Carbotermal [6]	TiO_2 cubierto de C vulcan $10^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta $600^\circ\text{C}/30\text{min}$ y posterior <i>quenching</i>	Anatasa
Combustión [10-12]	Ti metálico + NH_4NO_3 + urea	Ti metálico
	Ti metálico + H_2O_2 + urea	Ti metálico
	Ti metálico + NH_4NO_3 + sacarosa	Ti metálico
	Ti metálico + H_2O_2 + sacarosa	Ti metálico
	Ti metálico + Isopropóxido Ti (IV) + H_2O_2 + urea	Anatasa
	Isopropóxido Ti (IV) + NH_4NO_3 + sacarosa	Anatasa
	Isopropóxido Ti (IV) + H_2O_2 + sacarosa	Anatasa

* Tipo de bolas utilizadas en las distintas síntesis mecanoquímicas.

Como se explica en el capítulo III, tras el estudio mediante DRX llevado a cabo en las distintas composiciones obtenidas al someter los polvos de TiO_2 , tanto *recién preparados* como *calcínados*, a un primer tratamiento térmico a 1400°C en atmósfera de $\text{N}_2:\text{H}_2$ (90:10) a 3h, se estableció que era necesario incrementar el tiempo de plató a 1400°C a 12h para obtener muestras con mezcla de $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_4\text{O}_7$ a partir de los materiales de TiO_2 (**Fig. 3.4**). Además se comprobó que la cantidad de muestra introducida en el horno jugaba un papel importante en la reducción del material, mediante la creación de diferentes presiones parciales de oxígeno (P_{O_2}) en función de dicha cantidad. Para mayores cantidades de muestra, se creaban mayores P_{O_2} *in situ* durante el tratamiento, y por tanto, las muestras se reducían menos. Lo contrario ocurría cuando disminuía la cantidad de muestra introducida, que las P_{O_2} disminuían y con ello mejoraba la reducción. Además, controlando la dirección del flujo de gas, es decir, haciendo que éste incidiera más directamente sobre la muestra, los materiales mostraron

una mayor reducción, puesto que el oxígeno desprendido de la muestra, se evacua más rápidamente gracias al flujo de gas, disminuyendo la P_{O_2} . Los resultados de estos ensayos se resumen en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Resumen de tratamientos térmicos y condiciones, usados para la obtención de fases de TiO_2 reducidas, así como las fases encontradas en su estudio por DRX.

Tratamiento		DRX
1400°C/3h $N_2:H_2$ (90:10)		TiO_2/Ti_6O_{11}
1400°C/12h	Altas P_{O_2}	Ti_6O_{11}/Ti_5O_9
$N_2:H_2$ (90:10)	Bajas P_{O_2}	Ti_5O_9 , Ti_5O_9/Ti_4O_7
1400°C/12h $N_2:H_2$ (90:10) (Flujo de gases directo)		Ti_4O_7

Finalmente, los polvos de TiO_2 recién preparados, los polvos calcinados, los discos densos (1.5 y 3mm de espesor) y los substratos tridimensionales (tubos y esponjas) se sometieron a un tratamiento térmico de 1400°C durante 12 horas en atmósfera de $N_2:H_2$ (90:10), a bajas P_{O_2} (**Fig. 4.4**).



Fig. 3.4 Obtención de Ti_4O_7/Ti_5O_9 en diferentes conformados vía reducción de TiO_2 mediante tratamiento térmico (1400°C/12h) en atmósfera reductora ($N_2:H_2$ (90:10)).

En el caso de los polvos, se usaron para evaluar su capacidad de neutralización de radicales relacionándolo, como se verá más tarde en el Capítulo V, al papel que juega el estado de oxidación en el mecanismo de neutralización. Los discos densos de 3 mm se destinaron a la fabricación de electrodos para distintos ensayos.

3.2.5 Obtención de TiN en polvos y muestras densas

El TiN conformado como polvos y discos densos se obtuvo a partir de las muestras de TiO₂ calcinado mediante tratamiento térmico en atmósfera de NH₃ [13]. Se realizaron distintos tratamientos térmicos a 600°C, 700°C, 800°C, 900°C, 1100°C y 1200°C durante 3h todos ellos. El tratamiento a 1100°C/3h es seleccionado en base a los resultados obtenidos por DRX, que muestra una fase mayoritaria de TiN Osbornita, y conductividad eléctrica alta, de 3×10^4 S/cm. La **Tabla 3.4** resume los resultados obtenidos de estas dos caracterizaciones de todos los materiales obtenidos. Del material obtenido por tratamiento térmico a 1100°C/3h se realiza una caracterización más exhaustiva de su superficie por XPS, ángulo de contacto y SEM, así como, del comportamiento electroquímico del material para su uso como electrodo. Todo ello se encuentra en el capítulo VI Materiales para electrodo en biomedicina.

Tabla 3.4. Resumen de los resultados obtenidos de la caracterización por DRX y conductividad eléctrica para los materiales obtenidos por diferentes tratamientos térmico en NH₃

Tratamiento térmico	DRX	Máximo σ (S/cm)
600°C/3h	TiO ₂	$2.5 \cdot 10^{-2}$
700°C/3h	TiO ₂	1
800°C/3h	TiO ₂	5.5
900°C/3h	TiN + TiO ₂	300
1100°C/3h	TiN + trazas TiO ₂	$3 \cdot 10^4$
1200°C/3h	TiN	$6.5 \cdot 10^2$

3.3 Síntesis y procesamiento cerámico de CeO_2

El CeO_2 se propuso para el estudio de la actividad y mecanismo de neutralización de radicales, puesto que al igual que el TiO_2 , posee mezcla de estados de oxidación +3 y +4. Además de la síntesis de polvos de CeO_2 , se propuso la síntesis de $(\text{CeO}_2)_{0.98} (\text{CaO})_{0.02}$, para llevar a cabo la preparación de sustratos densos mediante su posterior sinterización en aire.

La síntesis, tanto del CeO_2 como del $(\text{CeO}_2)_{0.98} (\text{CaO})_{0.02}$, se llevó a cabo utilizando el método de combustión [11, 12, 14, 15]. En este tipo de síntesis, es necesario partir de un precursor preferiblemente oxidante, que suele ser nitrato, a poder ser hidratado que al liberar el agua de cristalización facilite la disolución de los reactivos. Para la síntesis de los materiales mencionados se empleó nitrato de Ce (III) hexahidratado, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, 99%), como combustible, se usó el más común de todos, la urea, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (Aldrich, 98%). En el caso del material modificado con Ca, para facilitar el proceso de posterior sinterización, se añade nitrato de Ca(II), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Aldrich, 99%). La mezcla se coloca en un reactor de pyrex se calienta a 100-200°C en manta calefactora, a dicha temperatura los reactivos funden permitiendo una mejor homogenización de la mezcla inicial, entonces la temperatura se aumenta a 300°C de manera que el combustible descompone liberando energía y la ignición de la mezcla tiene lugar manifestándose mediante la aparición de una llama. La energía liberada en la descomposición del combustible es la que permite que se produzca la reacción de síntesis [10].

Los polvos de CeO_2 obtenidos, se tamizan a través de una luz de malla de 100 μm . Los polvos de $(\text{CeO}_2)_{0.98} (\text{CaO})_{0.02}$, tras ser calcinados a 600°C y tamizados, se prensan isostáticamente a 1200kPa y se sinterizan a 1400°C durante 4 horas en aire. A estos últimos se les añadió la impureza de cal para ayudar a que la sinterización tuviera lugar.

3.4 Caracterización de materiales de TiO_2

3.4.1. Polvos *recién preparados* y calcinados de TiO_2

El primer paso en la obtención de los materiales empleados en este trabajo es la obtención del TiO_2 . Los análisis térmicos mediante ATD-TG de la muestra recién preparada, **Fig. 3.5** muestran un primer pico endotérmico a 133°C que se asocia a la pérdida de H_2O , un segundo pico exotérmico a 268°C que se asocia a la volatilización de restos de Isopropóxido de Ti (IV) y finalmente, un pico exotérmico muy intenso a 407°C que está asociado a la combustión de los restos orgánicos del proceso de síntesis, estos tres procesos conllevan una pérdida de peso del 22.5%.

El análisis por DRX del TiO_2 *recién preparado* presenta un patrón con baja cristalinidad, **Fig. 3.6(a)**, en el que es difícil localizar reflexiones asociadas a alguna fase cristalina. Además, este polvo precipitado tiene una elevada área de superficie específica, con un valor medio de $285 \pm 29 \text{ m}^2/\text{g}$, y su distribución de tamaño de partícula muestra una curva de tipo monomodal con aglomerados de $1 \mu\text{m}$ de media (d_{50}), constituidos, sin embargo, por pequeñas partículas de 6 nm aproximadamente, observadas y medidas por TEM (**Fig.3.8 b**).

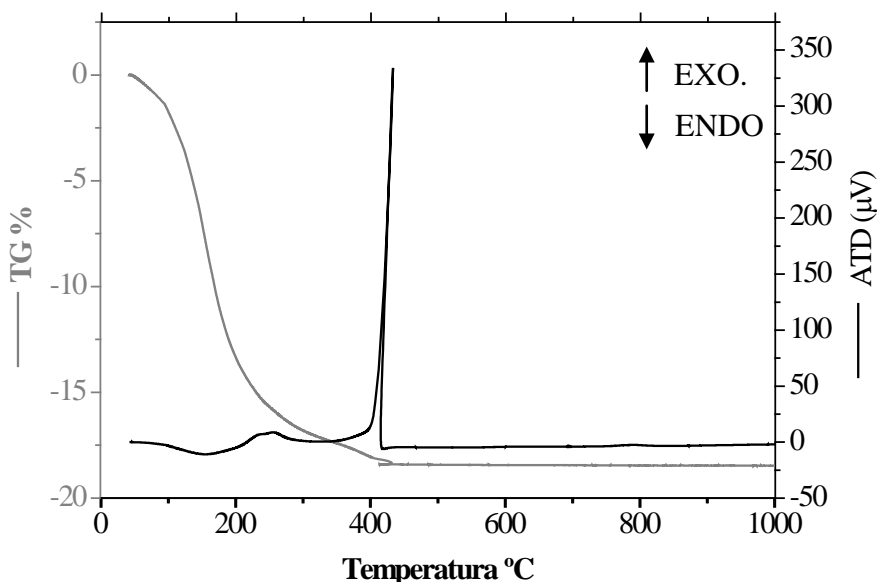


Fig. 3.5. ATD-TG de los polvos de TiO_2 *recién preparados*.

Además, se realizó un estudio de DRX de los polvos *recién preparados*, y calcinados a diferentes temperaturas durante 12h, para evaluar la evolución de la cristalinidad y la composición de fases del polvo de TiO_2 con la temperatura de calcinación (**Fig 3.6**) y (**Fig.3.7**).

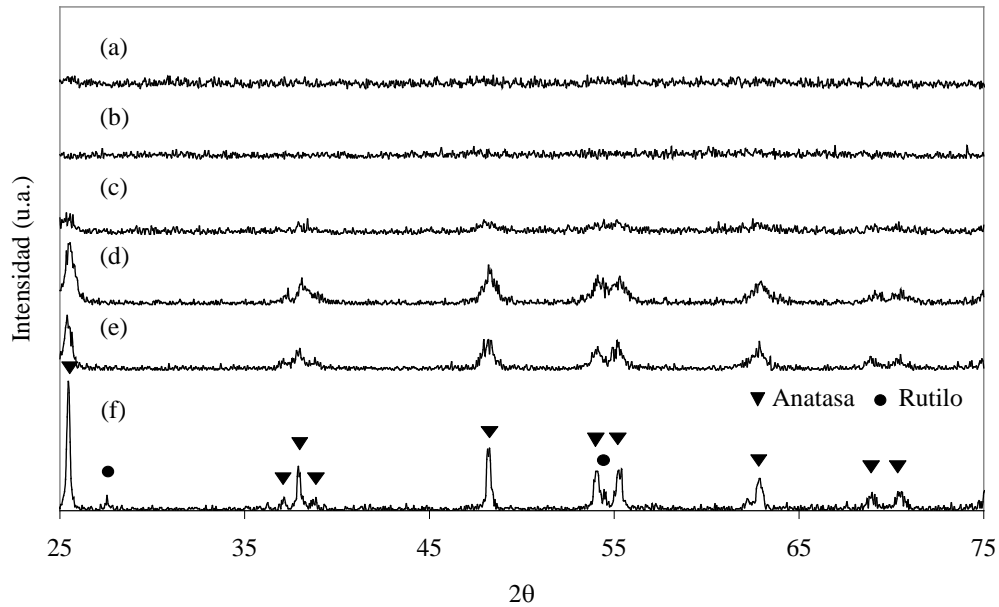


Fig. 3.6 DRX de los polvos de TiO_2 *recién preparados* (a), calcinados a 100°C (b), 200°C (c), 300°C (d), 400°C (e), y 600°C (f).

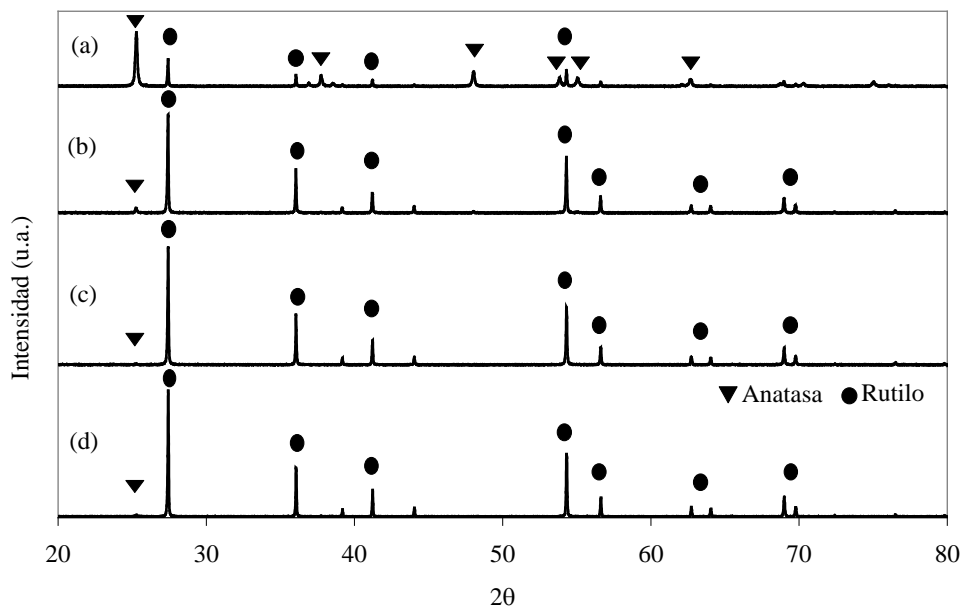


Fig. 3.7 DRX de los polvos de TiO_2 calcinados a (a) 600°C, (b) 650°C, (c) 700°C y (d) 750°C.

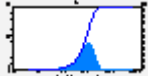

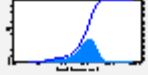






Se observa en los espectros de DRX de las diferentes calcinaciones que la fase anatasa con baja cristalinidad, **Fig. 3.6 a**, que se encuentra en los polvos *recién preparados*, se va cristalizando a medida que se aumenta la temperatura del tratamiento térmico de calcinación, **Fig. 3.6 b, c, d y f**. Después de calcinar a 600°C/12h, la fase anatasa se encuentra perfectamente cristalizada, coexistiendo con un 23 % en peso de fase rutilo, **Fig. 3.7 d**. A partir de aquí, al aumentar la temperatura de calcinación el porcentaje en peso de fase anatasa decrece a favor del aumento del % en peso de fase rutilo **Fig. 3.7**. Los porcentajes de fases cristalinas se calcularon desde el patrón de DRX siguiendo el método descrito por A. Zachariah [2]. Los resultados de dichos cálculos se muestran en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5 Porcentaje en peso de fase rutilo y anatasa en los polvos de TiO₂ calcinados entre 600°C y 750°C, calculado a partir de los difractogramas de DRX de cada material.

Muestra	% en peso de rutilo	% en peso de anatasa
TiO ₂ 600°C	23	77
TiO ₂ 650°C	87	13
TiO ₂ 700°C	97	3
TiO ₂ 750°C	98	2

Otras características del material en polvo que se ven afectadas con la temperatura de calcinación son la superficie específica y el tamaño de partícula. Los datos de superficie específica y la distribución del tamaño de partícula de las diferentes calcinaciones se muestran en la **Tabla 3.6**. Dichos resultados son coherentes con lo esperado, ya que a mayor temperatura de calcinación aumenta el tamaño de partícula y consecuentemente disminuye la superficie específica a causa del tratamiento térmico.

Tabla 3.6. Datos de distribución de tamaño de partícula y superficie específica de los polvos sometidos a distintas temperaturas de calcinación. Los valores de distribución de tamaño de partícula indican los valores entre los que se encuentran las curvas obtenidas, y el tamaño (y el % de partículas de ese tamaño) en el máximo de la distribución. Las gráficas muestran una distribución monomodal (para TiO_2 recién preparado y calcinados hasta 400°C) y bimodal (para TiO_2 calcinados desde 600°C hasta 750°C).

Muestras	Superficie Específica (m^2/g)	Distribución de Tamaño de Partícula (μm)		
TiO_2 recién preparado	285	0.1-100		15 (40%)
TiO_2 100°C	265	0.2-50		15 (40%)
TiO_2 200°C	186	0.2-50		15 (40%)
TiO_2 300°C	110	0.2-50		15 (40%)
TiO_2 400°C	74.5	0.2-50		10 (40%)
TiO_2 600°C	15	0.5-50		2 (20%) 10 (20%)
TiO_2 650°C	1.9	0.5-80		2 (20%) 20 (20%)
TiO_2 700°C	1.2	0.5-80		2 (20%) 20 (20%)
TiO_2 750°C	1.4	0.5-100		2 (20%) 50 (30%)

Los polvos *recién preparados*, debido al tamaño de partícula nanométrico que tienen, tienden a aglomerarse. Es por ello, que la medida de distribución de tamaño de partícula realmente está midiendo el tamaño de aglomerado y no el de las partículas individuales. Cuando se calcinan dichos polvos el tamaño de los aglomerados tiende a crecer. Esto se observa mediante micrografías de TEM de distintos polvos de TiO_2 **Fig. 3.8**

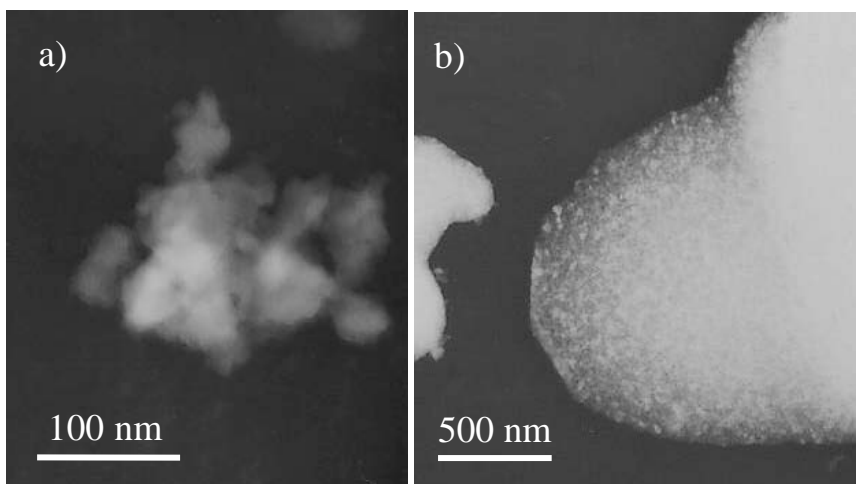


Fig. 3.8 Micrografías de TEM de polvos de TiO_2 a) *recién preparados* b) *calcinados a 600°C*.

Por último, se llevó a cabo la caracterización de los materiales descritos mediante espectroscopia UV-Vis, a partir de los espectros realizados de los materiales y transformados a Kubelca-Munk (**Fig. 3.9 y 3.10**), para posteriormente calcular y representar la raíz cuadrada del coeficiente de absorción ($\alpha^{1/2}$) vs. energía del fotón (E_γ) (**Fig. 3.11 y 3.12**), se determinó el valor del intervalo de energías prohibidas, también conocido como *Band Gap* usando la ecuación propuesta por Van Leeuwen y col. [16]. En dichas figuras se puede observar que, aunque existe diferencia en los bordes de absorción, la ordenada en el origen de la recta que representa cada una de las pendientes del coeficiente de absorción vs. energía del *Gap*, se encuentra muy próxima entre los espectros obtenidos para los polvos calcinados a 200°C y 400°C, donde sólo existe fase anatasa, y los obtenidos para los polvos calcinados a 650°C, 700°C y 750°C.

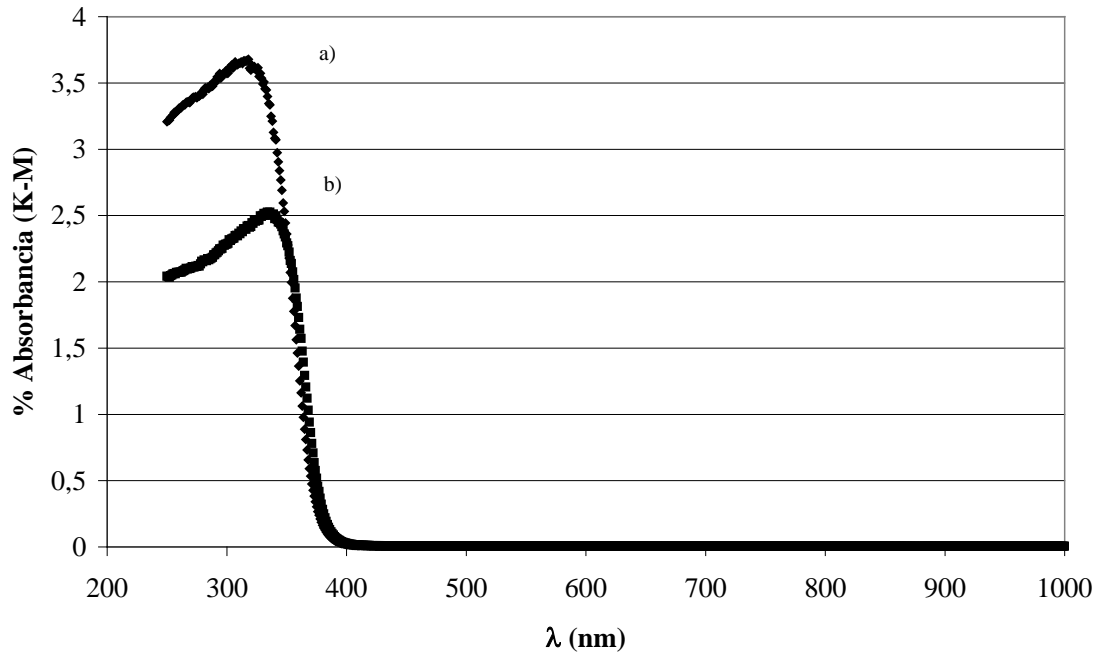


Fig. 3.9 Espectros obtenidos por UV-Vis y transformados a Kubelca-Munk de los, de los materiales en polvo TiO_2 calcinados a a) 200°C y b) 400°C .

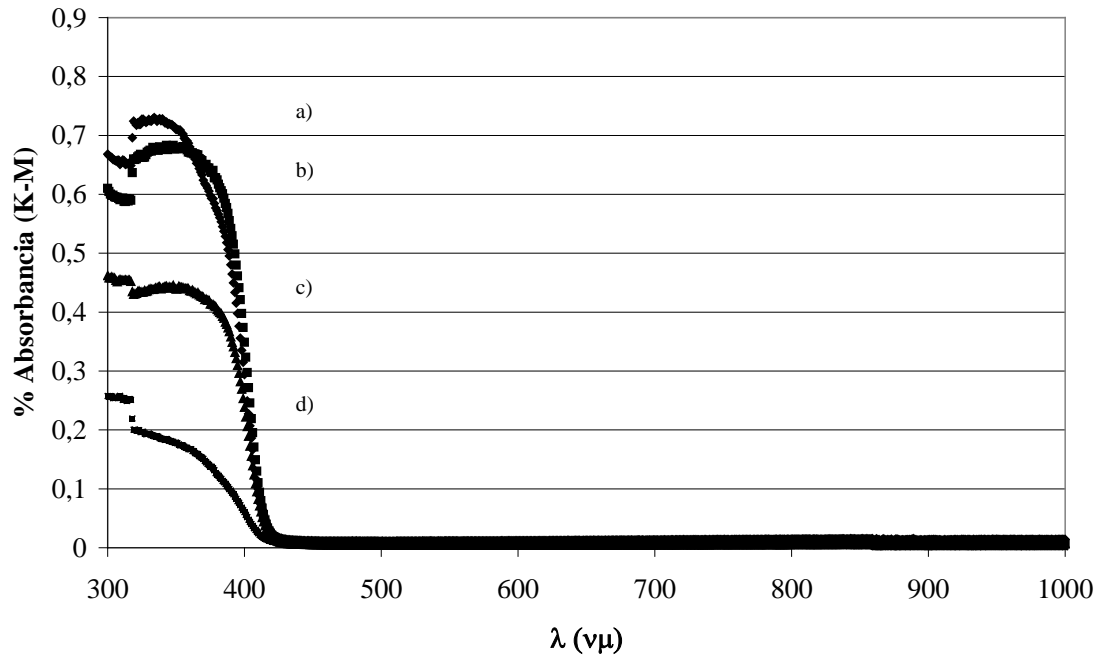


Fig. 3.10 Espectros obtenidos por UV-Vis y transformados a Kubelca-Munk de los, de los materiales en polvo TiO_2 calcinados a a) 600°C , b) 650°C c) 700°C y d) 750°C .

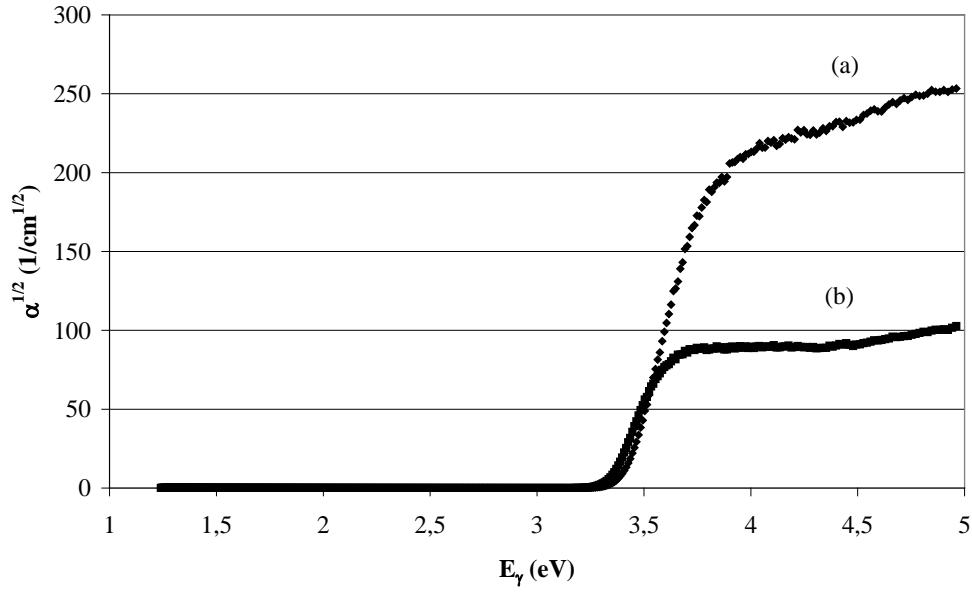


Fig. 3.11 Raíz cuadrada del coeficiente de absorción ($\alpha^{1/2}$) vs. energía del fotón (E_γ), tras la transformación a Kubelca-Munk de los espectros obtenidos por UV-Vis, de los materiales en polvo TiO_2 calcinados a a) 200°C y b) 400°C, para obtener la pendiente de las rectas correspondientes a la ecuación de Van Leeuwen [16].

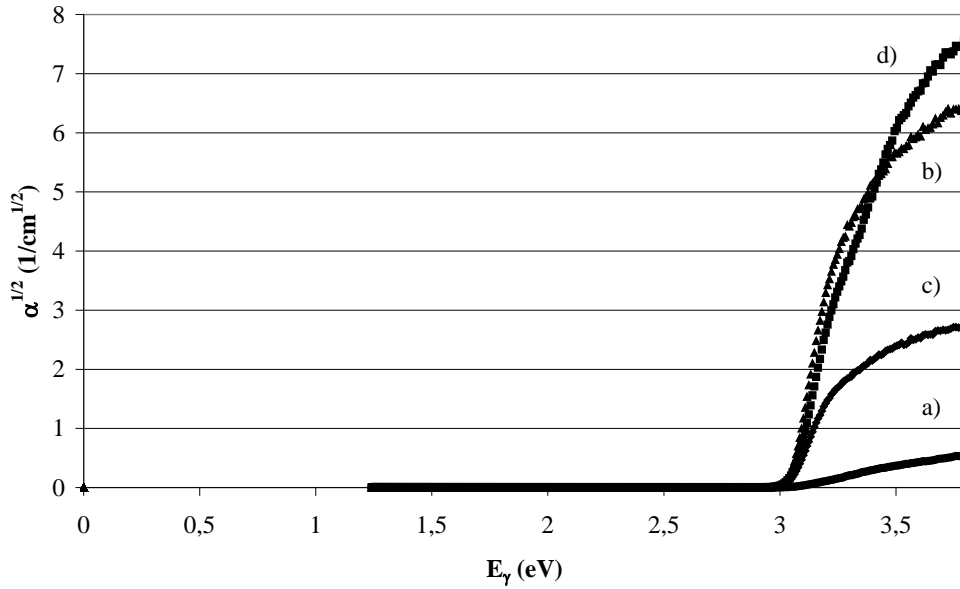


Fig. 3.12 Raíz cuadrada del coeficiente de absorción ($\alpha^{1/2}$) vs. energía del fotón (E_γ), tras la transformación a Kubelca-Munk de los espectros obtenidos por UV-Vis, de los materiales en polvo TiO_2 calcinados a a) 600°C, b) 650°C c) 700°C y d) 750°C, para obtener la pendiente de las rectas correspondientes a la ecuación de Van Leeuwen [16].

Los resultados de dichos cálculos para cada uno de los materiales se muestran en la **Tabla 3.7**. Como conclusión se puede decir que a partir de los polvos calcinados a 600°C el *Band Gap* disminuye con la temperatura de calcinación, es decir, con el aumento del % en peso de rutilo. Este resultado ha sido observado por otros autores, que reportan valores de energía de *Band Gap* de 3.2 eV para la fase anatasa y de 3.0 eV para la fase rutilo [2, 17].

Tabla 3.7 Medidas de *Band Gap* de los polvos de TiO₂ recién preparados y calcinados a diferentes temperaturas

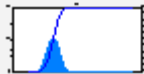
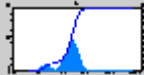
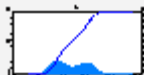
Muestra	<i>Band Gap</i> (eV)
TiO ₂ recién preparado	3.30
TiO ₂ 200°C	3.40
TiO ₂ 400°C	3.32
TiO ₂ 600°C	3.10
TiO ₂ 650°C	3.04
TiO ₂ 700°C	3.03
TiO ₂ 750°C	3.00

3.4.2. Polvos de TiO₂ comerciales

Para la realización de los ensayos de reactividad frente a las especies radicales de nitrógeno y oxígeno, fue necesario contar con una serie de materiales comerciales empleados como control. Para ello se seleccionaron tres materiales que pretendían tener la siguiente composición de fases: uno compuesto por anatasa, otro por rutilo y un tercero que presentase mezcla de las dos fases. Todos los polvos se caracterizaron empleando DRX, **Fig 3.13**, distribución de tamaño de partícula, superficie específica y se calculó % en peso de fases rutilo y anatasa en su composición por el método de A. Zachariah [2] y los valores de sus *Band Gaps* mediante espectroscopía UV-Vis por el método de Van Leeuwen [16] (**Fig. 3.14**). El resultado general de esta caracterización está expuesto en la **Tabla 3.8**. Se puede apreciar que los diferentes materiales poseen valores de superficie específica y tamaño de partícula que no parecen guardar entre ellos ningún tipo de relación, directa o inversa, con los valores de *Band Gap*. No obstante, los

porcentajes de anatasa y rutilo calculados para cada uno de ellos sí que parece mantener una relación con los valores de *Band Gap*, el cual, disminuye con el aumento de fase rutilo en el material.

Tabla 3.8 Caracterización de materiales en polvo de TiO₂ comerciales, usados como control. Los valores de distribución de tamaño de partícula indican el tamaño (y el % de partículas de ese tamaño) en el máximo de la distribución. Las gráficas muestran una distribución monomodal (para TiO₂ Anatasa Aldrich T8141) y bimodal (para TiO₂ Rutilo Aldrich 204757 y Rutilo Aldrich 634662).

Muestra	% en peso rutilo	% en peso anatasa	Superficie específica (m ² /gr)	Distribución de tamaño de partícula (μm)	<i>Band Gap</i> (eV)
Anatasa Aldrich T8141	≤ 1	≥ 99	9.5	0.5 (50%) 	3.38
Rutilo Aldrich 204757	94	6	2	0.2 (10%) 3 (50%) 	3.09
Rutilo Aldrich 634662	71	29	24.2	0.6 (25%) 10 (20%) 	3.33

Los difractogramas de Rayos X (**Fig. 3.13**) muestran muy bien cómo en el caso de los polvos que son comercializados como rutilo (Aldrich 204757 y 634662) no sólo contienen mezcla de fases anatasa/rutilo, sino que el porcentaje de cada fase es diferente dependiendo del procesamiento que haya tenido lugar en los distintos casos. Según los cálculos realizados a partir de las DRX, se ha estimado que las muestras Aldrich 204757 y 634662 pueden ser comparables, en cuanto a los porcentajes anatasa/rutilo a las muestras de TiO₂ obtenidas por precipitación y calcinadas entre 600-750°C.

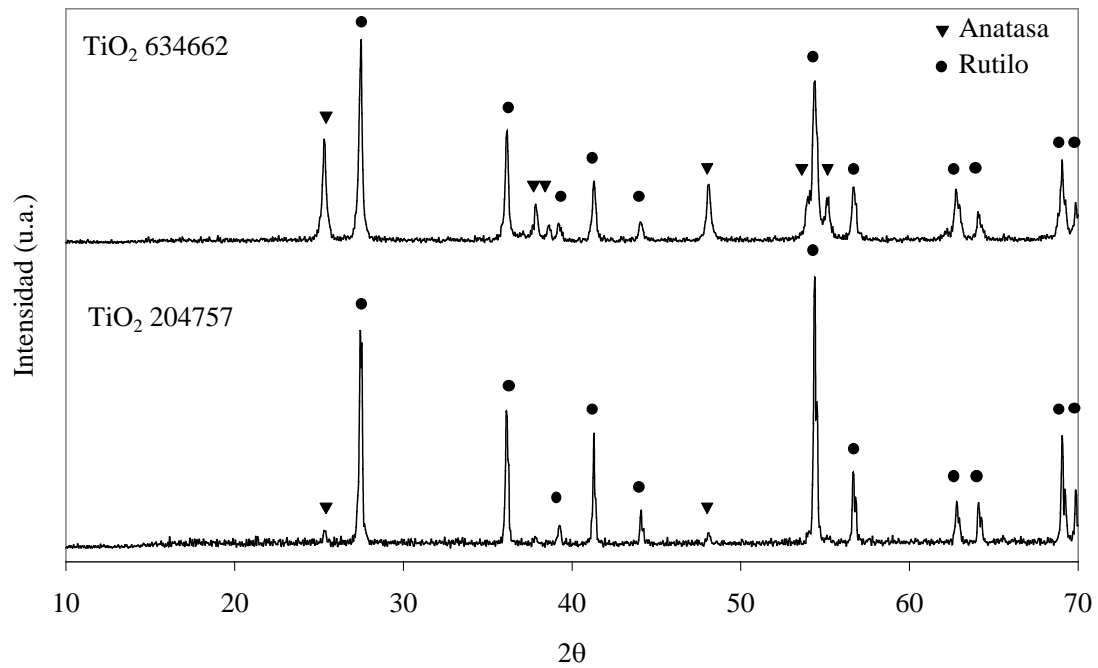


Fig. 3.13 DRX de materiales en polvo de TiO_2 rutilo comerciales.

Como en el caso de los polvos sintetizados en este trabajo, por el método sol-gel y posterior precipitación, se calculan los *Band Gaps* a partir de los espectros de Kubelca- Munk obtenidos por espectroscopía UV-Vis (**Fig. 3.14**). En la **Fig 3.15** se puede apreciar la ordenada en el origen de la recta que representa cada una de las pendientes del coeficiente de absorción vs. energía del *Gap*, es menor cuanto menor es el porcentaje de rutilo del material.

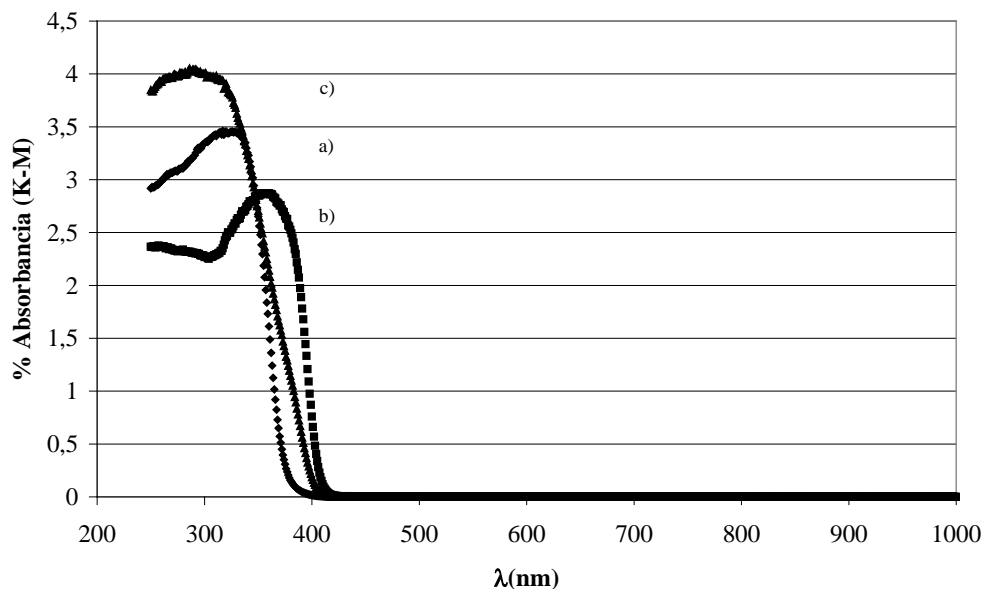


Fig. 3.14 Espectros obtenidos por UV-Vis y transformados a Kubelca-Munk de los, de los materiales en polvo TiO_2 comerciales de Aldrich (a) T8141 (1% Rutilo), (b) 204757 (71% Rutilo) y (c) 634662 (94% Rutilo).

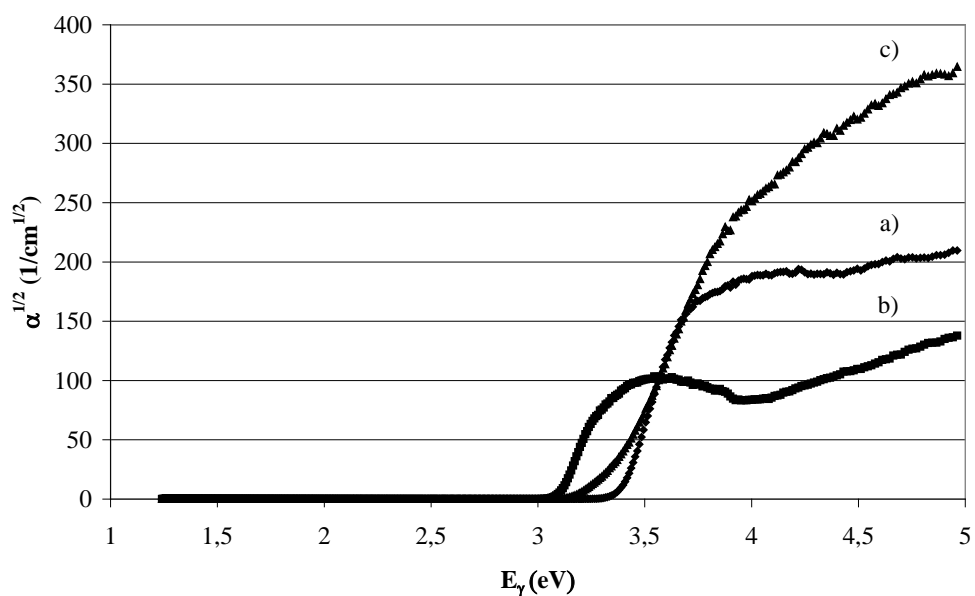


Fig. 3.15 Raíz cuadrada del coeficiente de absorción ($\alpha^{1/2}$) vs. energía del fotón (E_γ), tras la transformación a Kubelca-Munk de los espectros obtenidos por UV-Vis, de los materiales en polvo TiO_2 comerciales de Aldrich (a) T8141 (1% Rutilo), (b) 204757 (71% Rutilo) y (c) 634662 (94% Rutilo), para obtener la pendiente de las rectas correspondientes a la ecuación de Van Leeuwen [16].

Las propiedades morfológicas de estos materiales comerciales dependerán del procesamiento al que hayan sido sometidos para obtener cada material, para nosotros desconocido. Por lo tanto, no se puede seguir una relación entre sus propiedades y el método de síntesis, como ocurre en los polvos sintetizados y procesados en este trabajo. No obstante, es importante hacer notar que el *Band Gap*, sí continúa poseyendo una estricta relación inversamente proporcional al porcentaje en peso de rutilo en la muestra, es decir que disminuye a medida que aumenta el % en peso de rutilo. Los valores calculados para la energía del *Band Gap* de los materiales comerciales son superiores a los calculados para los polvos sintetizados en este trabajo, aunque dichos resultados presentan coherencia entre sí. Por ejemplo, el rutilo Aldrich 634662 que contiene un 71% en peso de rutilo y presenta un valor de 3.33eV, muy superior al del polvo calcinado 600°C/12 h, que con sólo un 23% rutilo disminuye su valor de energía del *Band Gap* a 3.10 eV.

El tratamiento térmico al que se someten los polvos *recién preparados* o al que fueron sometidos los comerciales durante su procesamiento, hace que las partículas se agreguen obteniendo un tamaño de partícula característico en cada caso, así mismo provocan transformaciones de fase obteniéndose porcentajes de fases rutilo/anatasa también característicos según el material. Algunos autores han señalado que, tanto el tamaño de partícula como la composición de fases provocan un efecto sinérgico que afecta al valor del *Band Gap* [2].

3.4.3 Muestras densas en forma de discos de TiO₂

En base a la dilatometría de los polvos de TiO₂ *recién preparados* **Fig. 3.16**, se sugirieron diferentes tratamientos térmicos para la sinterización con diferentes temperaturas y tiempo de duración. En trabajos anteriores se llevaron a cabo cultivos celulares neuronales sobre los distintos sustratos obtenidos por los diferentes tratamientos térmicos de sinterización [1]. Como se explica a continuación, el sustrato sinterizado a 1400°C/4h fue el que dio los mejores resultados celulares, y por ello se escogió para realizar el resto de los estudios. Por ello, tras la compactación y prensado de los polvos de TiO₂ calcinados a 600°C, se procedía a sinterizar las muestras a 1400°C durante 4h. En ninguno de los casos se pulieron las superficies, puesto que los residuos, de las resinas necesarias para el embutido de las muestras y de su posterior pulido,

parecían resultar tóxicos para las células neuronales usadas en los ensayos llevados a cabo.

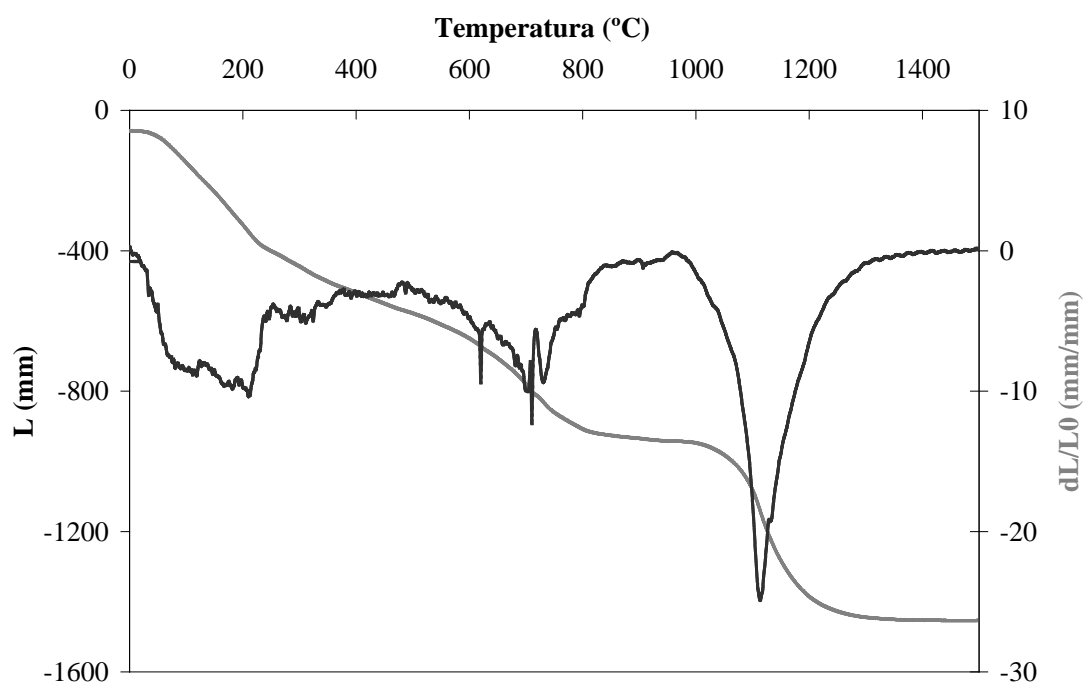


Fig. 3.16. Dilatometría del polvo de TiO_2 recién preparado. Rampa de calentamiento $2^\circ\text{C}/\text{min}$, en aire hasta 1600°C .

3.4.3.1 Estudio para la elección del tratamiento térmico de sinterización

El trabajo se inició con polvos de TiO_2 comerciales (Quimiamel, 99%) prensados, que se sometieron a diferentes tratamientos térmicos de sinterización donde se varió la temperatura, manteniendo el tiempo de tratamiento fijo de 8 horas en aire (Tabla 3.9).

Tabla 3.9 Muestras de TiO_2 comercial sometidas a diferentes tratamientos de sinterización.

Nombre	Temperatura($^\circ\text{C}$)	Tiempo (h)
C-I	1300	8
C-II	1400	8
C-III	1500	8
C-IV	1600	8

A partir de las micrografías obtenidas por microscopía confocal de luz reflejada que se realizaron de cada una de las muestras, en cuatro zonas diferentes para cada una de ellas, se calculó la distribución de tamaño de grano medio. Éste está representado como área de grano en la **Fig. 3.17 B**, donde se observa como aumenta el área con la temperatura de sinterización.

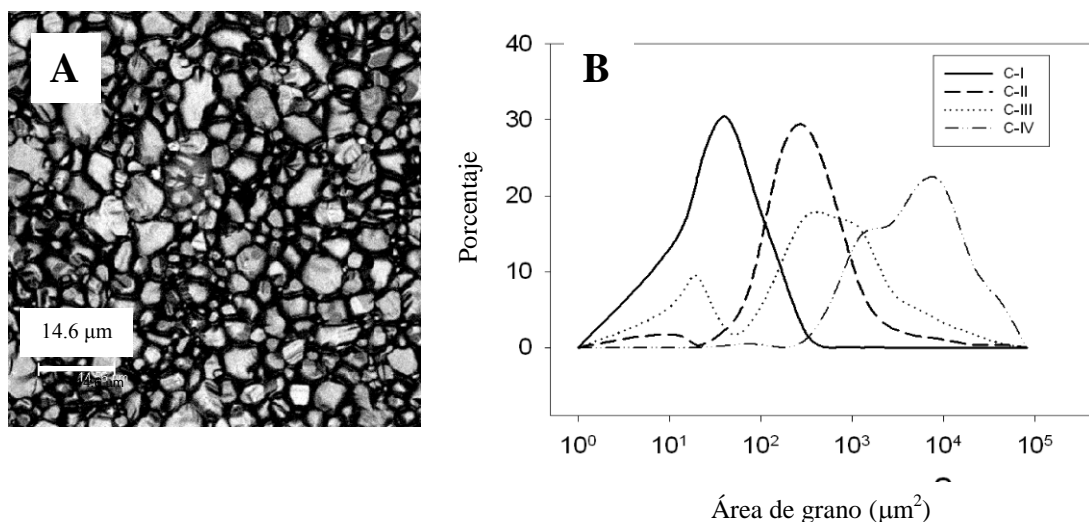


Fig. 3.17 a) Micrografía de la superficie de una muestra de TiO_2 comercial sinterizada (rutilo) a 1300°C durante 8h (muestra C-I) b) Distribución del tamaño de grano en las superficies de TiO_2 comercial sometidas a los distintos tratamientos térmicos de sinterización.

Sobre todas las muestras se realizaron cultivos celulares con células neuronales obtenidas de la corteza cerebral de embriones de rata tipo Wistar E14, durante cuatro días *in vitro*. Se observó que las muestras C-II fueron las únicas que no mostraron diferencia alguna respecto al control en cuanto a supervivencia celular se refiere. En el resto de muestras la supervivencia celular era inferior siendo las de tipo C-IV las que peores resultados mostraron. (**Fig. 3.18 a**). Por otro lado, se observó que, con respecto al número de neuritas primarias que crecieron en las células cultivadas sobre los diferentes sustratos, fue con la muestra C-I(1300°C) con la que se obtuvieron resultados comparables con el control (**Fig. 3.18 (b)**). En cualquiera de los casos fueron las muestras sinterizadas a mayor temperatura (C-III y CIV) las que no dieron resultados convenientes para ser consideradas para su posterior utilización en los diferentes ensayos realizados en este trabajo.

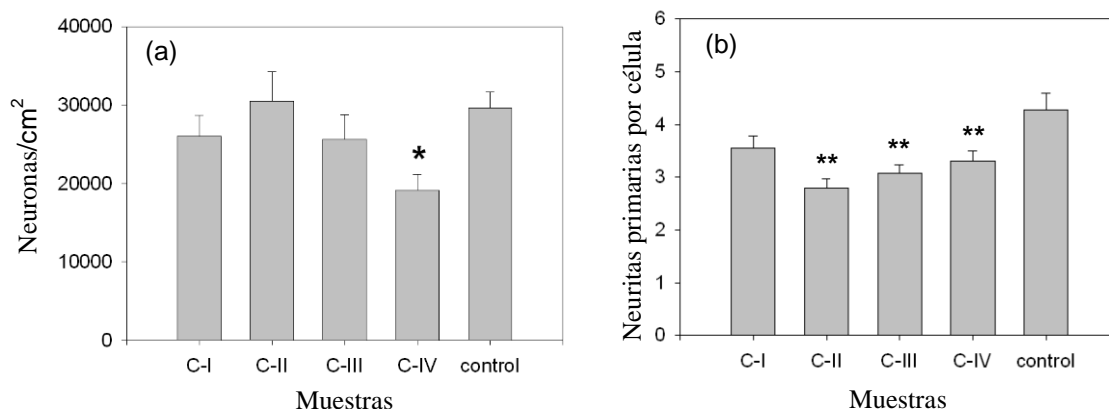


Fig. 3.18 Medidas en cultivos celulares de células neuronales de la corteza cerebral de embriones de rata tipo Wistar E14, tras cuatro días *in vitro* sobre muestras de TiO₂ comercial sinterizadas con diferentes tratamientos térmicos, C-I, C-II, C-III y C-IV, de (a) supervivencia de neuronas *p < 0.05 y (b) neuritas por célula. **p < 0.001.

Los mismos estudios se realizaron con los polvos obtenidos por precipitación y *calcinados* sometidos a distintos tratamientos de sinterización variando temperatura, y el tiempo de tratamiento únicamente en la temperatura de 1400°C (**Tabla 3.10**). Para estas muestras se ve cómo el aumento del tiempo de tratamiento aumenta el área de grano (P-I, P-II y P-III). No obstante, el aumento en el tamaño de grano (**Fig. 3.19**) se hace mucho más evidente con la temperatura de tratamiento que cuando se incrementa el tiempo del mismo.

Tabla 3.10 Diferentes tratamientos de sinterización llevados a cabo sobre muestras de TiO₂ *calcinado*.

Nombre	Temperatura(°C)	Tiempo (h)
P-I	1400	4
P-II	1400	8
P-III	1400	16
P-IV	1600	8

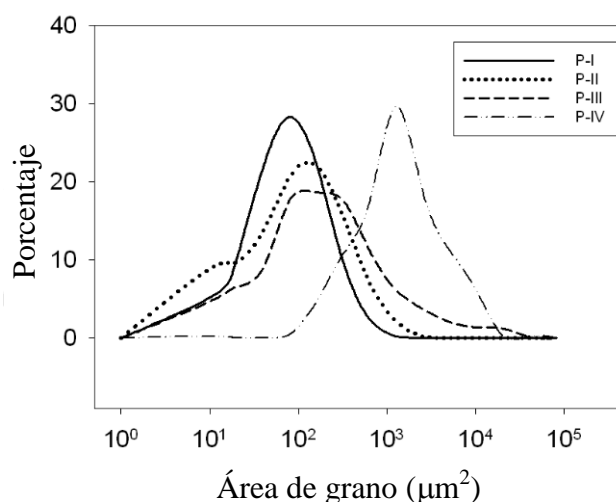


Fig. 3.19 Distribución del tamaño de grano en las superficies de TiO₂ calcinado sometido a los distintos tratamientos térmicos de sinterización.

Se hicieron cultivos celulares usando como sustratos P-I, P-II, P-III y P-IV y vidrio para cultivos como control. El número de neuronas que sobreviven sobre cualquiera de los sustratos después de cuatro días *in vitro* es comparable con el control (**Fig. 3.20 a**). No obstante, cuando se comprueban las neuritas que crecen tras el tiempo de cultivo, el único sustrato que muestra resultados comparables al control es el obtenido por tratamiento térmico a 1400°C durante 4h. El resto de sustratos muestran valores bastante inferiores al control (**Fig. 3.20 b**).

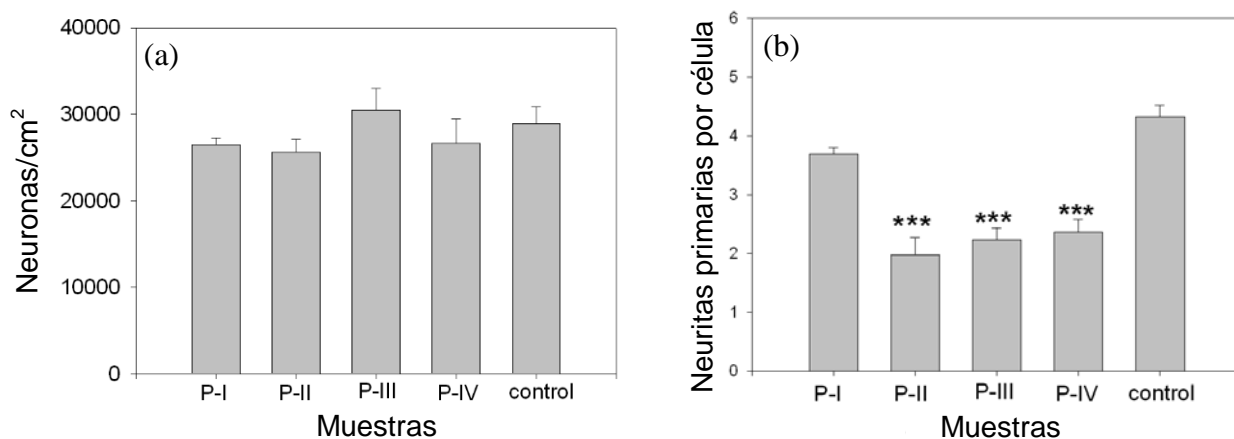


Fig. 3.20 Medidas en cultivos celulares de células neuronales de la corteza cerebral de embriones de rata tipo Wistar E14 tras cuatro días *in vitro* sobre muestras de TiO₂ calcinado sinterizadas con diferentes tratamientos térmicos P-I, P-II, P-III y P-IV de a) Supervivencia de neuronas y b) neuritas por célula. ***p < 0.001.

En las micrografías tomadas de los cultivos P-I, P-II y P-IV, así como del control, tras cuatro días de cultivo *in vitro*, se pueden apreciar los resultados cuantitativos mostrados anteriormente (**Fig. 3.20**). La diferencia en la cantidad de células neuronales que sobreviven sobre los diferentes sustratos se puede considerar que no es significativa, sin embargo, la morfología de las células, en lo que al brote y desarrollo de neuritas alrededor del cuerpo de la neurona se refiere, sí marca grandes diferencias entre sustratos (**Fig. 3.21**). Por un lado, las células neuronales cultivadas sobre sustrato de TiO₂ P-I muestran una gran similitud a las cultivadas sobre el sustrato control. Estos cultivos poseen células con mayor número de neuritas alrededor del cuerpo de la célula, las cuales, se han desarrollado longitudinalmente más, y además se puede apreciar, que entre ellas tienen lugar un número importante de interconexiones. Por el contrario, las células cultivadas sobre sustratos de TiO₂ P-II y P-IV, son más pobres tanto en el número de neuritas, y en el desarrollo longitudinal de las mismas, así como, en las interconexiones entre ellas. Entre las muestras A, B y C, de composición TiO₂ rutilo P-I, P-II y P-IV respectivamente, la diferencia más apreciable se encuentra en la microestructura superficial. Podría decirse que la microestructura más rica en borde de grano (P-I) favorece el correcto desarrollo de las células neuronales. En dicha muestra el área media de grano está entorno a 100 μm^2 , por lo que se podría decir que el diámetro medio de dichos granos está alrededor de 10 μm . En la **Fig 3.21 B y F** se puede percibir de manera más evidente cómo las células adhieren y desarrollan mejor en las zonas de grano menor, que son ricas en borde de grano. No obstante, ampliando algunos detalles **Fig. 3.22**, se puede advertir que las células crecen tanto en zonas de grano como en zonas de borde de grano, que según la morfología de sustrato que se encuentren se adaptan utilizando los caminos que menor gasto de energía les suponga el intentar sobrevivir.

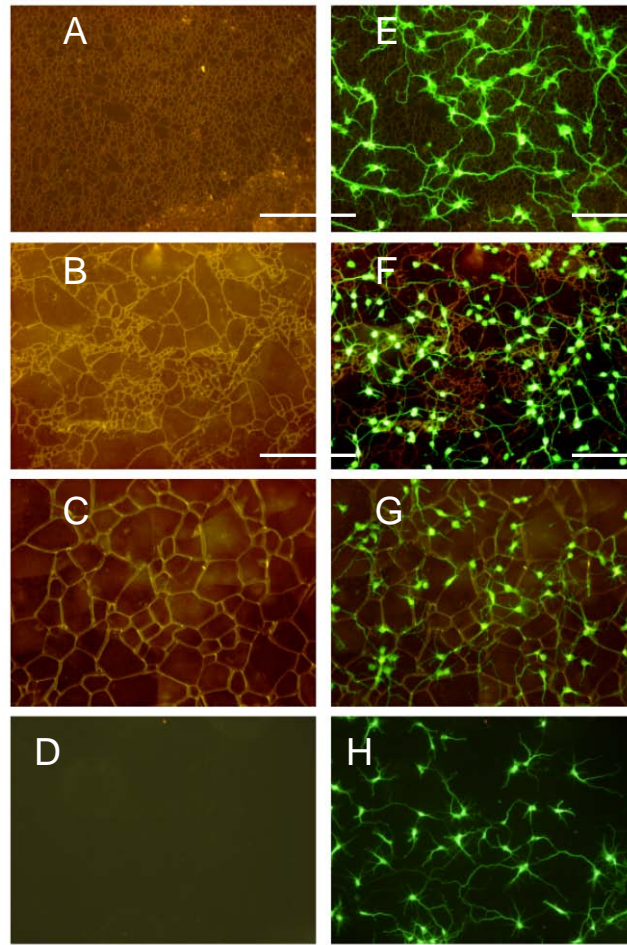


Fig. 3.21 Micrografías de la superficie de los substratos obtenidas con microscopio confocal de luz reflejada (A a D) y micrografías de los cultivos celulares, de células neuronales de la corteza cerebral de embriones de rata tipo Wistar E14, llevados a cabo sobre las superficies y obtenidas por microscopía de fluorescencia usando inmunocitoquímica de Tao para el marcaje de las células (E a H). A) y E) corresponden a la muestra P-I; B) y F) a la muestra P-II; C) y G) a la muestra P-IV; y finalmente, D) y H) es la muestra control realizada sobre cubre de vidrio de borosilicato. Barra de escala = 200 μm .

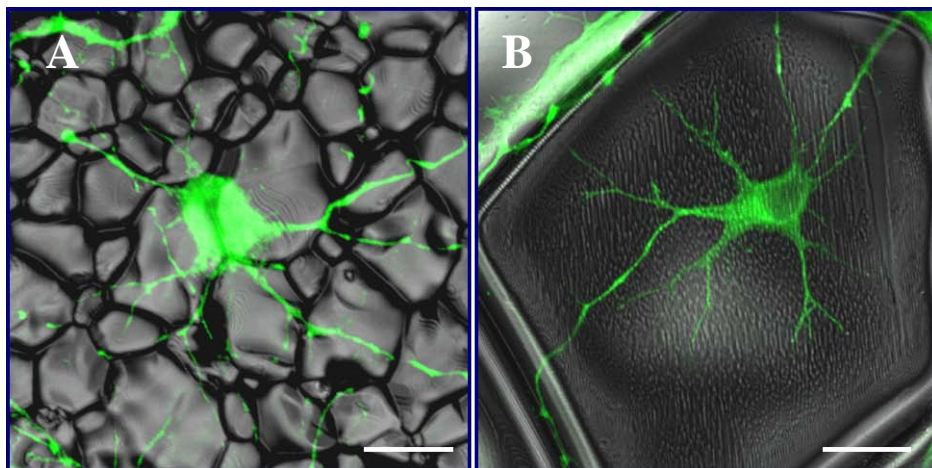


Fig. 3.22 Detalles de micrografías de los cultivos celulares de células neuronales de la corteza cerebral de embriones de rata tipo Wistar E14, llevados a cabo sobre las superficies de A) P-I y B) P-IV. La superficie se visualiza mediante microscopía confocal de luz reflejada. Barra de escala = 10 μm .

Esta diferencia en la morfología celular se puede observar de manera más detallada en una micrografías de las células realizadas a más aumentos de los cultivos celulares sobre el control, el P-I y el P-II (**Fig. 4.23**). En el caso de las células cultivadas sobre el sustrato de TiO_2 P-I, además de tener un número de brotes de neuritas en torno al cuerpo de la célula comparable al del control, estos brotes, parecen tener una longitud mayor sobre el sustrato P-I que sobre el control.

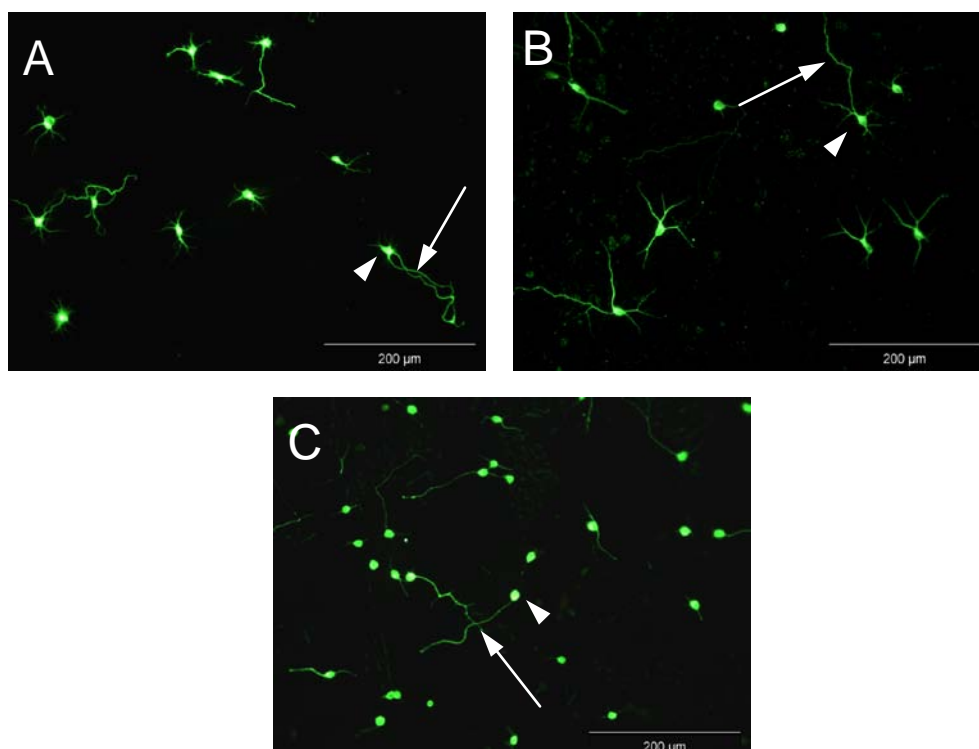


Fig. 3.23 Desarrollo de neuritas en cultivos neuronales, tras cuatro días *in vitro*, sobre (A) cubre de vidrio usado como control, (B y C) sobre sustratos densos de TiO₂ P-I y P-II, respectivamente.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos, donde se observa que la microestructura obtenida tras un tratamiento térmico de 1400°C/4h favorece la supervivencia de las células y el desarrollo de neuritas, se elige dicho tratamiento para la obtención de materiales destinados a cultivos celulares.

3.4.3.2 Estudio de la superficie de las muestras sinterizadas

El estudio de la superficie de los discos densos es muy importante puesto que dichas muestras se usarán como sustratos de cultivos celulares, sus características químicas y físicas tendrán gran importancia en la adherencia, supervivencia y crecimiento de las células, como se verá más adelante. En el difractograma de DRX de la superficie de la muestra sinterizada es posible indexar el TiO₂ en una única fase cristalina, que es rutilo (**Fig 3.24**). Se ha incluido en esta figura la DRX de la muestra calcinada a 600°C/12h, y comparando ambos difractogramas se observa cómo con la temperatura, la anatasa se ha transformado en rutilo. La densidad relativa de la muestra, medida por diferencia de pesada mediante el método Arquímedes, es del 98%. Esta

elevada densidad hace presuponer una superficie con poca porosidad, lo cual, será confirmado mediante MEB.

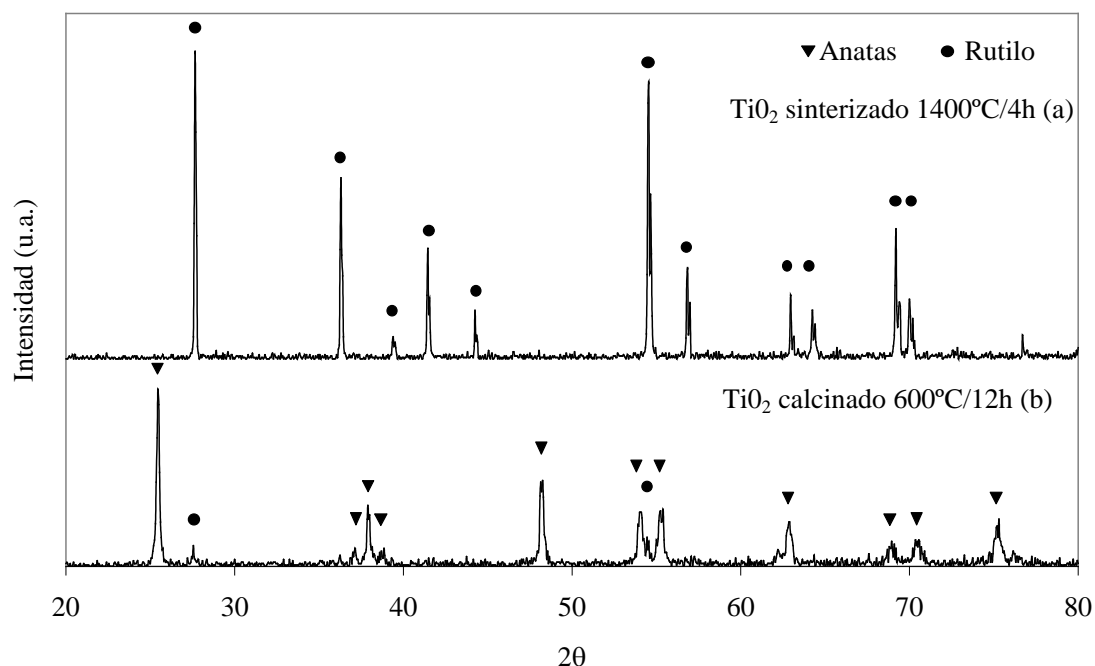


Fig. 3.24. DRX de los materiales de TiO_2 a) muestra sinterizada a 1400°C durante 4h b) polvos calcinados a 600°C 12h.

También se realizó un estudio del ángulo de contacto, medido por el método de la gota Sessile, es de 34° , **Fig. 3.25**. Este valor de ángulo indica la elevada hidrofiliicidad de la superficie estudiada, característica que, *a priori*, debe tener una buena superficie para la adhesión de proteínas y células [18].



Fig. 3.25. Ángulo de contacto de una gota de agua sobre sustrato de TiO_2 sinterizado a $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$ en forma de disco denso medido por el método de la gota Sessile.

Para finalizar, se estudió la microestructura y topografía de las superficies de los discos densos. En primer lugar se estudiaron las muestras sinterizadas a 1400°C/4h mediante MEB y AFM. En el AFM realizado sobre las muestras (**Fig. 3.26**) se puede observar que el diámetro de grano va desde 4 hasta 12 μm , y la rugosidad de la topografía. También se puede apreciar la formación de unos accidentes topográficos, denominados *terrazas*, que se encuentran en el orden de los nanómetros. Dichas terrazas son observadas y medidas en SEM (**Fig. 3.27** sus anchos van desde los 100 a los 400 nm, y a medida que se acercan a los bordes de grano se van haciendo más estrechas y evidentes).

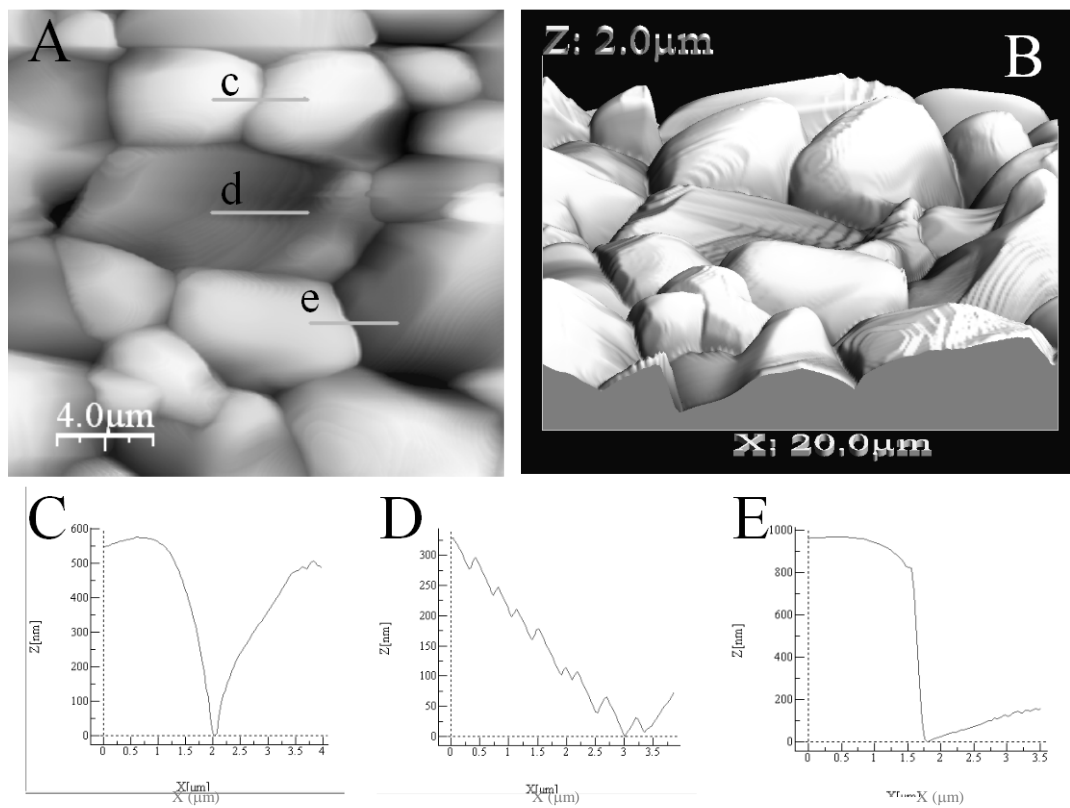


Fig. 3.26 AFM de la superficie de una muestra P-I. A) superficie en dos dimensiones B) visión 3-D del mismo área superficial. En ambas figuras la altura está representada en escala de grises, siendo las zonas más brillantes las partes más elevadas (máximo 2 μm) y las oscuras las más profundas (mínimo 0 μm). C), D) y E) corresponden a las medidas en el eje Z (en nm) de las líneas correspondientes y representadas en la figura A.

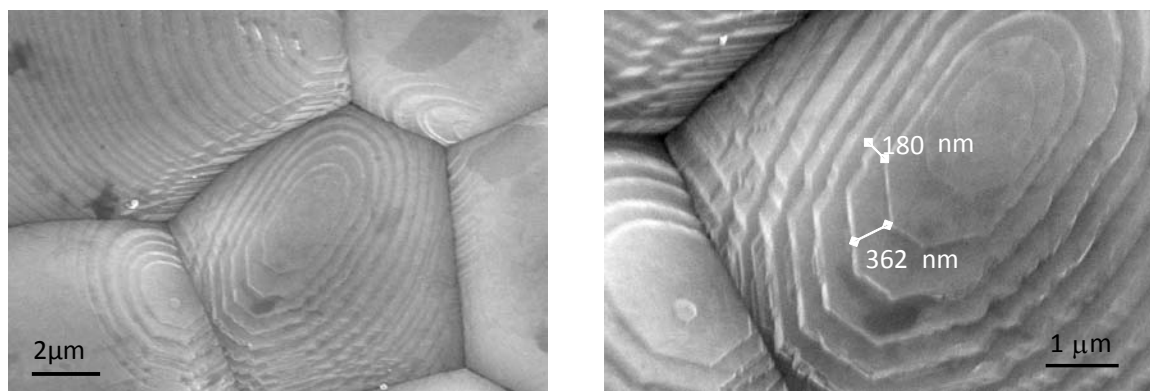


Fig 3.27 Micrografía SEM de la superficie de un disco denso de TiO_2 sinterizado a $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$. Se observan la formación de terrazas de orden nanométrico, encontrando dichas formaciones topográficas preferiblemente en las zonas de borde de grano.

En el caso de las muestras de TiO_2 preparadas para llevar a cabo cultivos celulares de *Xenopus* y posteriormente aplicar EF en DC, las cuales, tras un primer tratamiento de sinterizado a $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$, fueron sometidas a un segundo proceso de sinterizado a la misma temperatura y duración, se tienen tamaños de diámetro de grano comprendidos entre $5\mu\text{m}$ y $80\mu\text{m}$ **Fig. 3.28**, es decir, la distribución del tamaño de grano es muy amplia. Nuevamente se puede observa la formación de terrazas. En este caso el ancho de las terrazas es inferior y la mayoría no supera los 100 nm, como se aprecia en las micrografías MEB de la **Fig. 3.29**. Dichas terrazas son muy evidentes en zonas próximas al borde de grano.

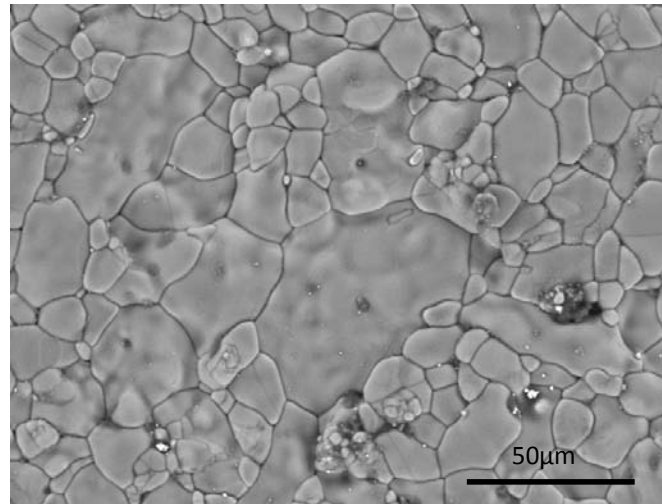


Fig. 3.28 Micrografía MEB de la superficie de un disco denso de TiO_2 , sinterizado en dos tratamientos térmicos de $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$. Tras el primer tratamiento térmico, la muestra densa se corta en micro-cortadora procediendo al segundo tratamiento térmico.

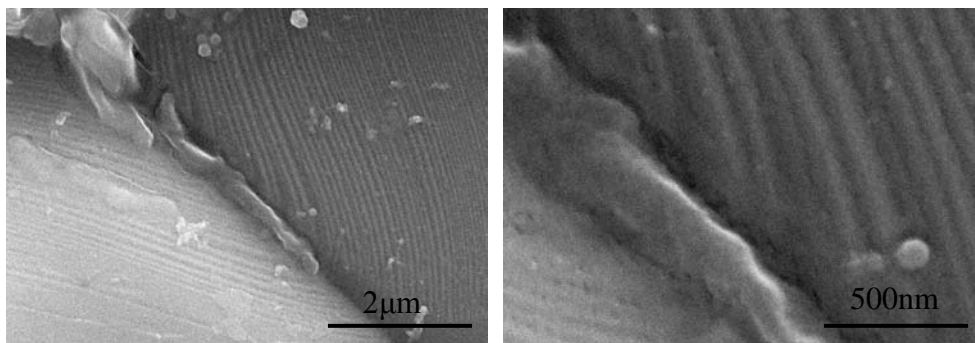


Fig. 3.29 Micrografía SEM de la superficie de un disco denso de TiO_2 sinterizado en dos tratamientos térmicos a $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$. Se observan la formación de terrazas de orden nanométrico, encontrando dichas formaciones topográficas preferiblemente en las zonas de borde de grano.

La microscopía de AFM revela la existencia de otro tipo de rugosidad, también del orden de nanómetros, que se encuentra en la superficie de los granos y a la cual se denominarán *colinas* a partir de aquí (**Fig. 3.30**).

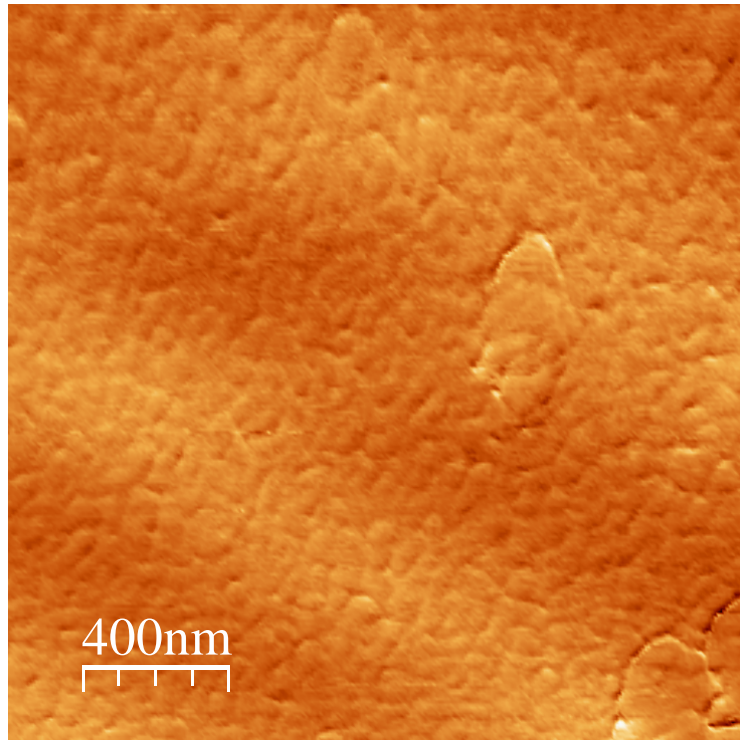


Fig. 3.30 Microscopía de AFM de la superficie de un disco denso de TiO_2 , sinterizado en dos tratamientos térmicos de $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$ procediendo al corte la muestra en microcortadora previamente al segundo tratamiento térmico. ($2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$)

La bibliografía indica la importancia de la topografía en la escala nanométrica en relación a la adhesión, supervivencia y morfología de las células que se desarrollan sobre una superficie [19]. Las moléculas que forman parte de la membrana celular encargándose del contacto y adhesión al sustrato se encuentran en el orden de los nanómetros y por tanto son susceptibles a las formaciones topográficas a esta escala. Por tanto, los accidentes topográficos encontrados en los materiales han de tenerse en cuenta en lo que al comportamiento celular sobre la superficie se refiere.

3.4.4 *Scaffolds* (Andamiajes 3D) en forma de tubos y esponjas de TiO_2

Según se ha explicado en la parte experimental, se prepararon dos tipos de *scaffolds*: tubos (*conduits*), formados por un solo conducto central, y esponjas cerámicas constituidas por una red cerámica de elevada porosidad. La morfología y microestructura de los *scaffolds* cerámicos obtenidos, tubos y esponjas, fue observada mediante una lupa óptica y mediante MEB.

Los tubos mostraban rigidez y suficiente estabilidad en el manejo. Se ha logrado con éxito la fabricación de un conducto central estable que no se colapsa en el proceso de sinterización. En la **Fig. 3.31** se muestran las fotos obtenidas de los tubos y semi-tubos preparados, los cuales, observados en la lupa óptica, revelaron a nivel macroscópico diámetros localizados entre 0.8 mm y 1.4 mm.

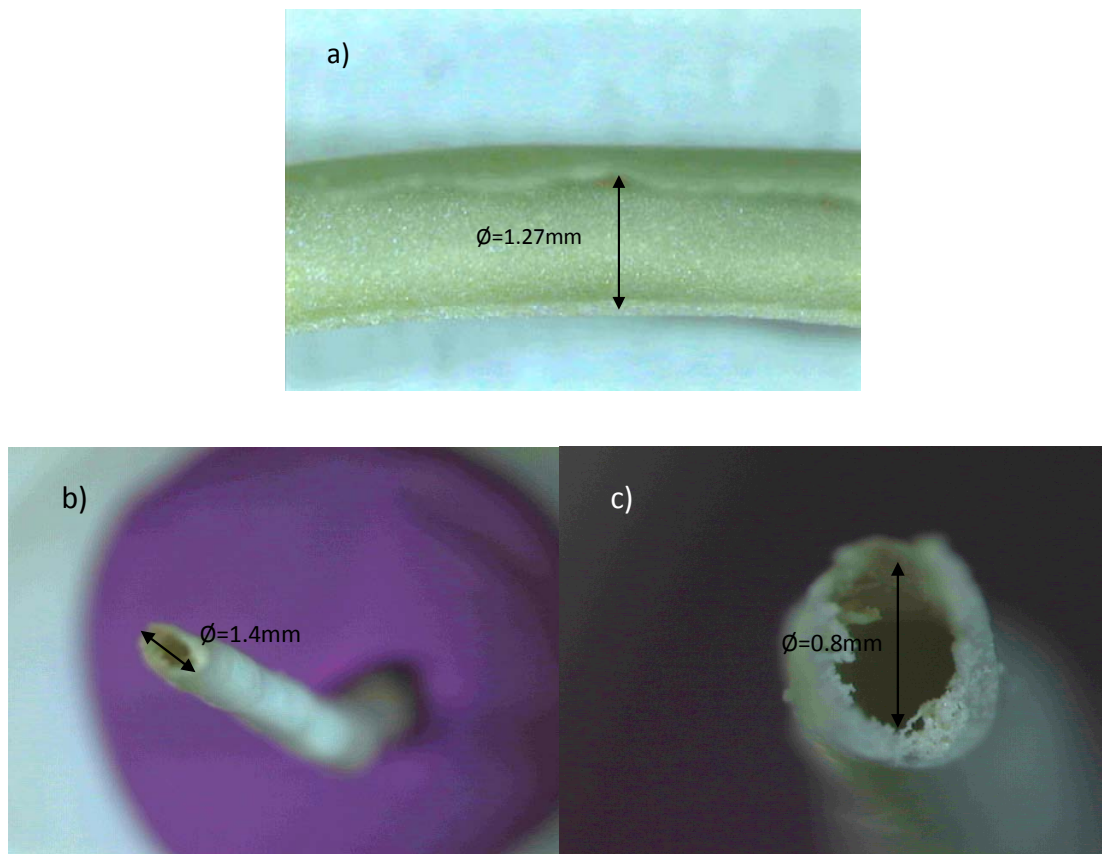


Fig. 3.31 Fotografías en lupa óptica de estructuras tridimensionales de TiO_2 conformadas como a) semi-tubos y b y c) tubos.

A nivel microscópico por medio de MEB, se observó que los tubos en su sección longitudinal presentaban una microestructura compuesta por una superficie compacta, poco porosa, con una distribución de tamaño de los granos amplia aunque siempre inferior a las 100 μ m (**Fig. 3.32 a**). En este tipo de materiales, se vuelve a observar la formación de terrazas en las inmediaciones de los bordes de grano, estas terrazas mantienen el mismo orden de tamaño (100-500 nm) que en el caso de los discos densos mostrados anteriormente, **Fig. 3.32 b y c**. Se puede afirmar por lo tanto, que en este caso la microestructura obtenida en los tubos y semitubos es comparable a la estudiada en los discos densificados a la misma temperatura y se puede esperar un comportamiento similar en los cultivos celulares.

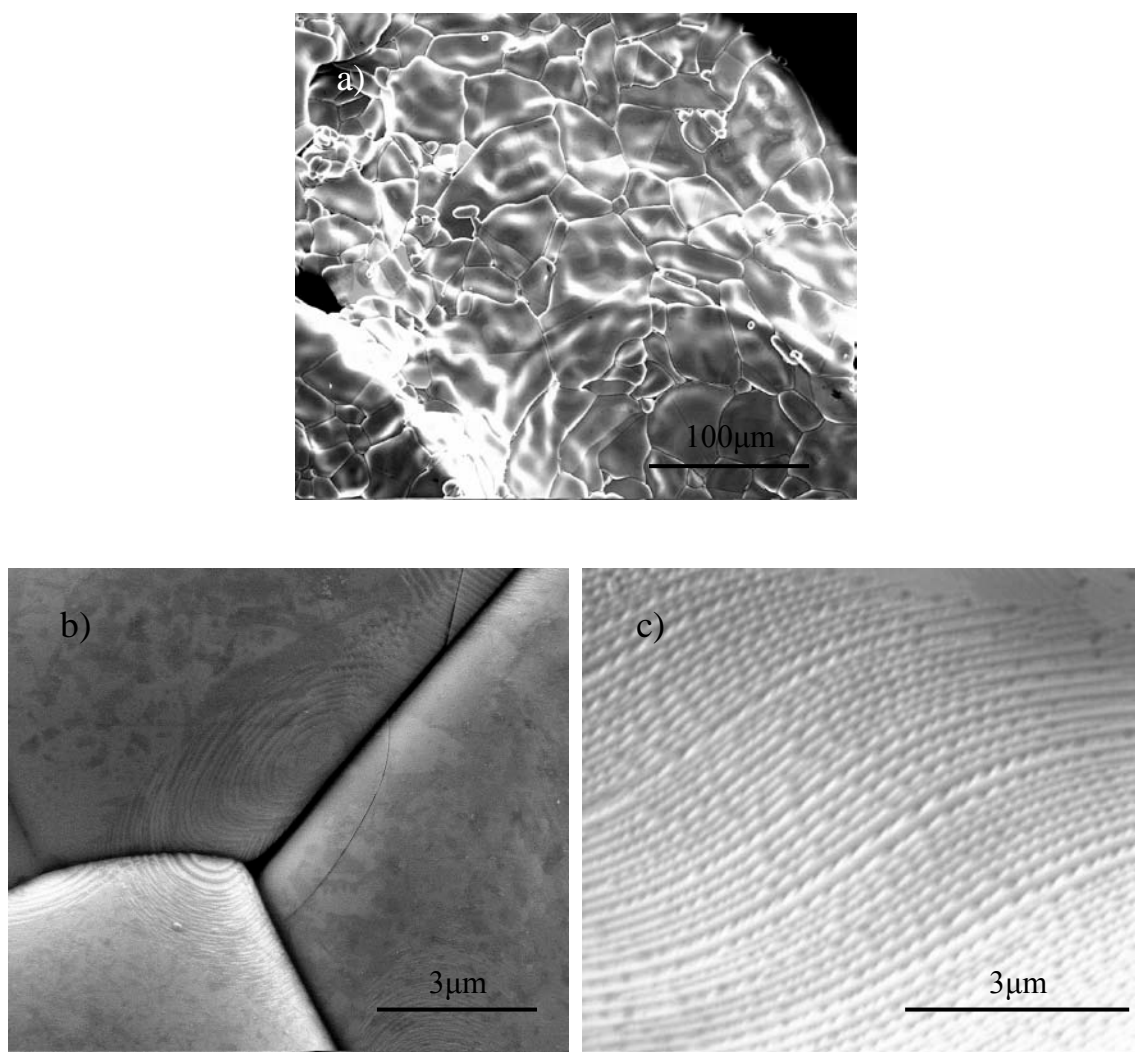


Fig. 3.32 Micrografías de MEB de estructuras tridimensionales de TiO₂ conformadas como semi-tubos, a) del conducto interior, b) detalle de formación de terrazas próximas al borde de grano y c) detalle de la zona de terrazas.

En el caso de las estructuras tridimensionales conformadas como esponjas, **Fig. 3.33**, una vez sinterizadas se obtuvieron estructuras de elevada porosidad, que eran rígidas y estables en su manejo, aunque frágiles. La observación macroscópica llevada a cabo mediante una lupa óptica revela la existencia de porosidad interconectada.

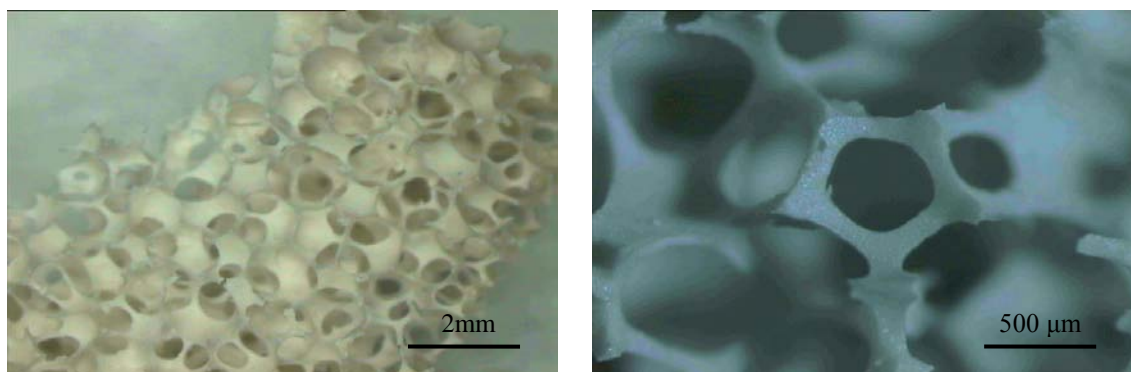


Fig. 3.33 Fotografías en lupa óptica de estructuras tridimensionales de TiO_2 conformadas como esponjas.

Este estudio ha demostrado la viabilidad de la preparación de estructuras 3D cerámicas. No obstante, dichas estructuras no fueron empleadas para la realización de ensayos celulares en este trabajo de tesis.

3.5 Caracterización de materiales CeO_2

3.5.1 Caracterización de polvos recién preparados de CeO_2 y $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$

Los polvos de CeO_2 obtenidos por el método de combustión son de color amarillo. Estos se sintetizaron con el objetivo de ser usados para el estudio de la actividad neutralizadora de radicales y como posibles sustratos. Se llevó a cabo la caracterización del material por DRX, distribución de tamaño de partícula y superficie específica y los resultados se compararon con el CeO_2 comercial (Aldrich 211575, 99.9% de pureza) que se usó como control.

Los espectros de DRX de los polvos preparados por combustión y comparados con los comerciales muestran una única fase pura de CeO_2 , con estructura cúbica tipo

fluorita (número de ficha 00-033-0334) (**Fig. 3.34**). En el difractograma se observa cómo la cristalinidad de estos polvos es menor que la de los comerciales.

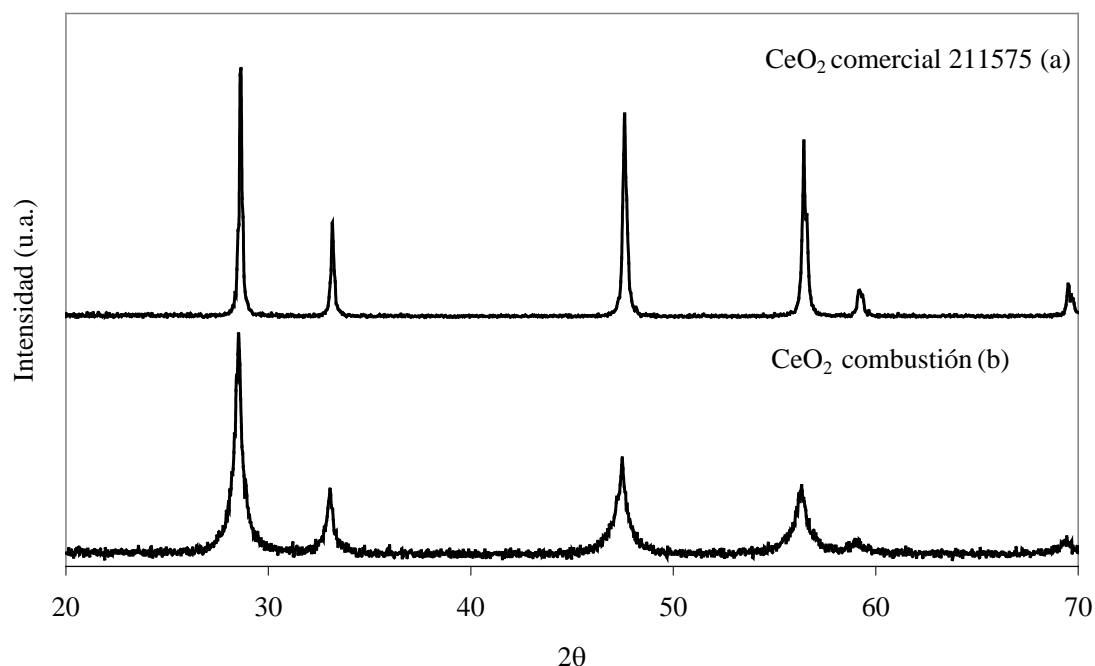
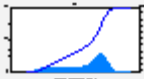
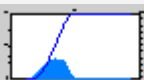


Fig. 3.34 DRX de CeO₂ obtenido (a) por el método de combustión y (b) comercial.

Por otro lado, se midieron la superficie específica y la distribución de tamaño de partícula tanto de los preparados por combustión como de los comerciales. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.11**. Se comprueba que en el caso de los polvos obtenidos por combustión la superficie específica es ocho veces mayor que en el caso de los comerciales. La distribución del tamaño de partícula de los polvos obtenidos por combustión es de tipo bimodal y recoge un amplio rango de tamaños, la mayoría superiores al de los comerciales cuya distribución es de tipo monomodal. No obstante, ocurre lo mismo que con los polvos de TiO₂ recién preparados, que en el caso de polvos nanoparticulados, realmente mide la distribución de tamaños de los aglomerados formados por partículas nanométricas individuales.

Tabla 3.11 Caracterización de superficie específica y tamaño de partícula de polvos de CeO₂ obtenidos por combustión y comerciales.

Muestra	Superficie específica (m ² /gr)	Tamaño de partícula (μm)		
CeO ₂	32,9	0,1-100		50 (30%)
CeO ₂ comercial	4,1	0,1-2		0.8 (30%)

Por otro lado, se sintetizaron también por el método de combustión, polvos de (CeO₂)_{0,98}(CaO)_{0,02}. La modificación de la estequiometría de los materiales llevada a cabo mediante el dopado con CaO tenía por objetivo lograr materiales susceptibles de una adecuada sinterización. Los polvos de CeO₂ no llegan a densificar totalmente, lo que puede suponer un problema en la realización de los experimentos de cultivos celulares. Los polvos así sintetizados en este caso son de color amarillo-anaranjado. Al igual que en la metodología seguida para la preparación de discos de TiO₂, para obtener los discos densos es necesario llevar a cabo la previa calcinación de los polvos. Se eligieron dos temperaturas de calcinación, 600°C y 800°C, en ambos casos los polvos estaban constituidos por la misma fase cristalina (CeO₂), el CaO entra en solución sólida en la estructura tipo fluorita de la Ceria, tal y como se demuestra al no existir segundas fases en el DRX. En base a las superficies específicas determinadas se continuó la preparación de los discos con la muestra calcinada a 600°C/12h (23,4 m²/g). Si se calcina el polvo a 800°C, la superficie específica disminuye hasta valores de 1,5 m²/g, lo que podría dificultar el proceso de prensado y posiblemente el de sinterización. Tanto los polvos obtenidos por combustión, como los calcinados a partir de estos, se estudiaron por DRX (**Fig. 3.35**) y se midió su superficie específica y su distribución de tamaño de partícula, los cuales, se exponen en la **Tabla 3.12**. La introducción de CaO en la composición aumenta la superficie específica de la ceria, pasando de 33 m²/g a 41 m²/g en las muestras dopadas. Sin embargo, el proceso de calcinación conlleva una disminución de esta superficie específica a la mitad. La distribución del tamaño de partícula es de tipo trimodal y en el proceso de calcinación pasa a ser de tipo bimodal desplazándose la campana de los tamaños mayores a valores superiores.

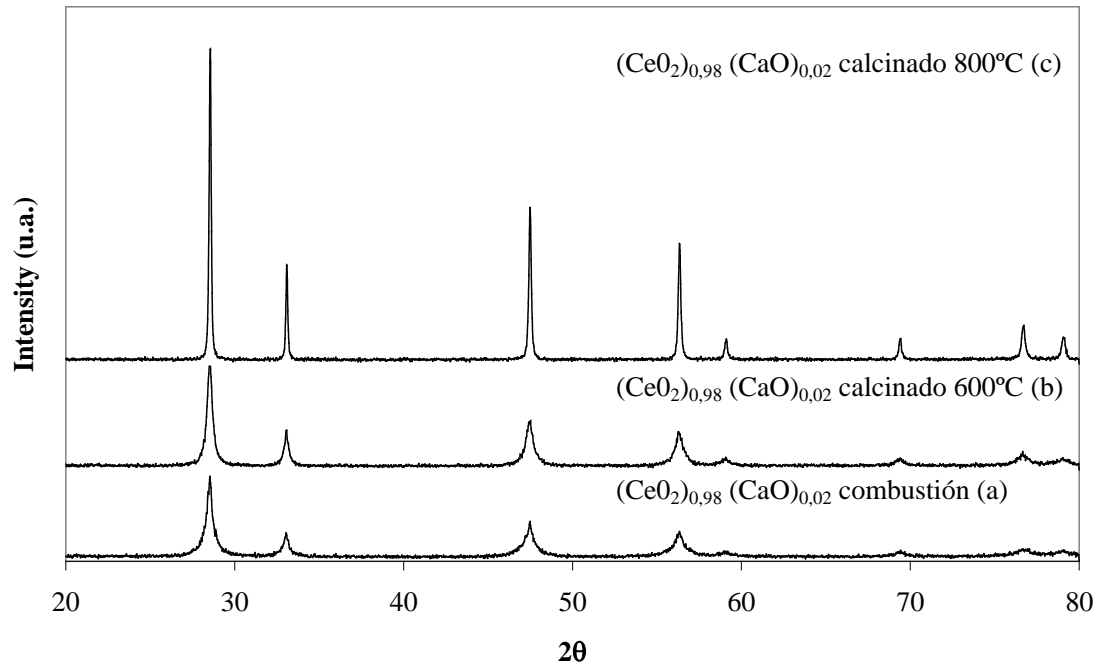


Fig. 3.35 DRX de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ obtenido (a) por el método de combustión y calcinado a (b) 600°C y (c) 800°C .

Tabla 3.12. Caracterización de los polvos de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ obtenidos por combustión y posteriormente calcinados.

Muestra	Superficie específica (m^2/gr)	Distribución de tamaño de partícula (μm)	
$(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$	40,6	0,1-100	0.2 (10%)
			20 (15%)
			30 (25%)
$(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ 600°C	23,4	0,1-200	0.4 (10%)
$(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ 800°C	1.5	0,1-200	50 (25%)
			0.4 (15%) 50 (20%)

3.5.2 Caracterización de discos densos de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$

Los polvos calcinados se compactan mediante prensado isostático y se sinterizan en aire a 1400°C durante 4h, tal y como se indicó en el capítulo de materiales y métodos, 3.2.3 Sinterización. Una vez cortados los discos de 6mm de diámetro y 1.5mm de espesor, se procedió a observar su microestructura mediante MEB, en la **Fig. 3.36** se puede observar que las muestras presentan una elevada densidad y que tiene una superficie compuesta por granos con un tamaño de grano homogéneo y pequeño ($\approx 1\mu\text{m}$), la topografía del material presenta una elevada rugosidad, y una mayor porosidad en comparación a las muestras densas de TiO_2 . La densidad del material, medida por el método de Arquímedes es de un 95%.

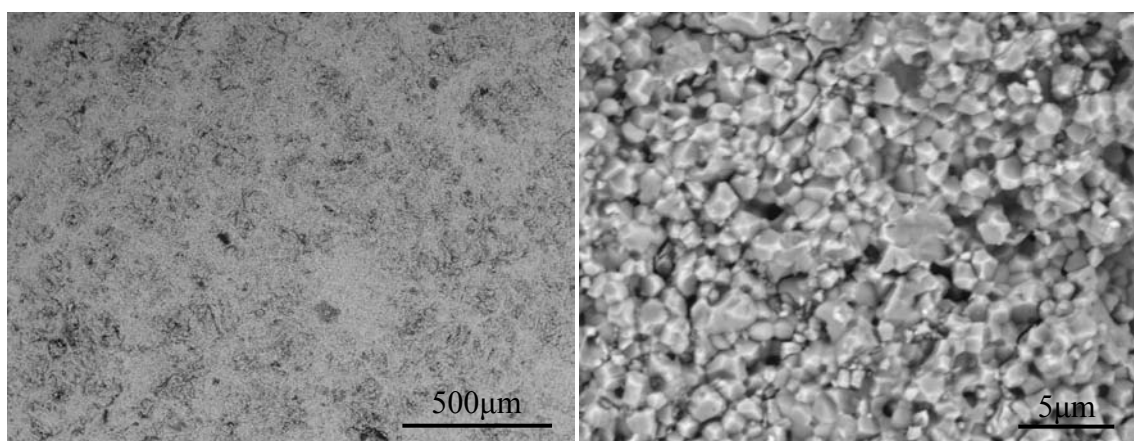


Fig. 3.36 Micrografías de SEM de discos densos de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ sinterizada a $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$.

También se realizó un estudio del ángulo de contacto, medido por el método de la gota Sessile, de la misma manera que hicimos con el TiO_2 . Como el ángulo se aprecia que será superior a 90° , el ajuste se realizó mediante el método de Young –Laplace. El cálculo del ángulo es de 134.6° (**Fig. 3.37**), es decir, la superficie es hidrófoba. Esto significa que existirá dificultad para la adhesión de proteínas y células.

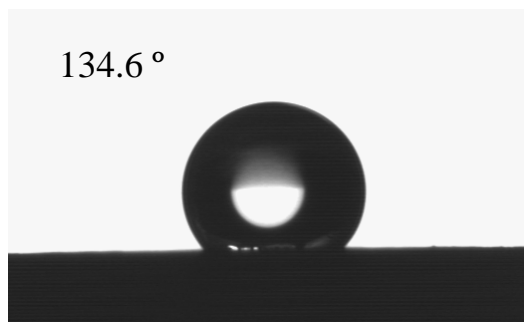


Fig. 3.37. Ángulo de contacto de una gota de agua sobre substrato de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ sinterizado a $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$ en forma de disco denso medido por el método de la gota Sessile.

3.6 Conclusiones

Las conclusiones de este capítulo se presentan organizadas en función de materiales obtenidos y procesamiento llevados a cabo. Dichos materiales se han conformado tanto en polvos como en muestras sinterizadas. La caracterización de los materiales descrita en este capítulo se orienta en dos caminos:

- ✓ En el caso de los polvos, la caracterización se orienta a correlacionar aspectos composicionales y microestructurales de los mismos con los resultados obtenidos del estudio de capacidad neutralizadora de radicales que se tratará en el Capítulo V.
- ✓ Por otro lado, para los materiales sinterizados, ya sean 2-D o 3-D, la caracterización química y microestructural de las superficies es fundamental para su aplicación como sustratos, ya que dichas superficies jugarán un papel muy importante en la adhesión, supervivencia y crecimiento de las células.

Materiales de TiO_2 :

- ✓ Conformados como polvos:
 - ❖ Los polvos de TiO_2 recién preparados, obtenidos por el método sol-gel con posterior precipitación, son polvos compuestos por fase cristalina anatasa amorfa que tienen la máxima superficie específica ($250 \text{ m}^2/\text{g}$) y el mínimo tamaño de partícula (6nm medidos en MET). A partir de ellos se obtienen los demás materiales de TiO_2 mediante procesamiento cerámico.
 - ❖ Es necesario llevar a cabo la calcinación de dichos materiales a diferentes temperaturas, lo que disminuye la superficie específica de los polvos y aumenta su tamaño de partícula. El aumento de la temperatura de calcinación, aumenta la cristalinidad de los polvos que se encuentran en fase anatasa. A partir de los 600°C , se produce un cambio de fase progresivo anatasa/rutilo, aumentando la fase rutilo en detrimento de la fase anatasa, a medida que se aumenta la temperatura
 - ❖ El aumento del porcentaje de fase rutilo en la muestra afecta al valor del *Band Gap* de los materiales. El aumento de fase rutilo provoca una clara disminución de la energía de *Band Gap*, de 3.4 a 3.0 eV

✓ Conformados como discos densos:

- ❖ Se selecciona un tratamiento térmico de sinterización de 1400°C/4h entre otros tratamientos térmicos, a diferentes temperaturas y tiempos de sinterización, puesto que es el que da lugar a una microestructura que en comparación al resto de muestras favorece el desarrollo más sano de la células. Esto se evalúa en base a supervivencia celular y desarrollo en número y longitud de las neuritas. Dicha microestructura posee tamaños de grano más pequeños y muy homogéneos (4-12 μm), y por tanto, es más rica en bordes de grano. En las proximidades de los bordes de grano se encuentran formaciones topográficas denominadas terrazas del orden de nanómetros, a las que las células pueden ser sensibles teniendo influencia en su desarrollo y morfología.
- ❖ Desde el punto de vista cristalográfico, los discos densos de TiO_2 muestran una fase única tipo rutilo y la superficie posee un marcado carácter hidrófilo, que favorecerá el desarrollo de las células, y una densidad relativa del 98%.
- ❖ Los discos densos sinterizados en dos tratamientos térmicos a 1400°C/4h, para cultivos poseen tamaños de grano muy heterogéneos de entre 10-80 μm . La superficie de estos granos se caracteriza por la formación , de nuevo, de terrazas de entre 100 a 400 nm en las proximidades de los bordes de grano y rugosidad de unos 100nm.

✓ Conformado en estructuras tridimensionales:

- ❖ Se obtuvieron materiales de TiO_2 conformados en estructuras tridimensionales como tubos y esponjas por el método de mojado por el método de impregnado usando como moldes estructuras poliméricas. En el tratamiento térmico de sinterización se incluye una primera fase donde dicho polímero volatilizan dejando hueco en la estructura el espacio que ocupaban.
- ❖ Los tubos son consistentes en el manejo y presentan un canal central estable con tamaños de diámetro de entre 0,8 a 1,4 mm. La superficie muestra poca porosidad y un amplio rango de tamaños de grano nunca

superior a $100\mu\text{m}$, semejante al obtenido en el caso de las muestras densas. En la superficie de dichos granos se observa, una vez más, la formación de terrazas en la proximidad de los bordes de grano.

- ❖ Las esponjas, aunque frágiles, son manejables y poseen una macroporosidad de tipo interconectado, con tamaños de poro de que permitiría su colonización por células y consecuente vascularización si se utiliza como implante.

Materiales de CeO_2 :

✓ Conformados como polvos:

- ❖ Tanto los polvos de CeO_2 , para el estudio de neutralización de radicales, como los de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$, para su posterior conformado en discos densos, se obtuvieron por el método de combustión. Los polvos de CeO_2 obtenidos por combustión presentan una menor cristalinidad que el comercial, el estudio de la distribución de tamaño de partícula indica una distribución de aglomerados más amplia que en el caso del material comercial ($0.1\text{-}100\ \mu\text{m}$ frente a $0.5\text{-}1\ \mu\text{m}$ en el comercial). El valor de superficie específica es significativamente mayor para el polvo sintetizado por combustión: $32.9\ \text{m}^2/\text{g}$ frente a $4.1\ \text{m}^2/\text{g}$ del comercial.
- ❖ El dopado con CaO favorece la densificación de los discos de CeO_2 . En una etapa previa a su densificación, los polvos de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ recién preparados fueron calcinados a 600°C , para su posterior prensado y sinterización.

✓ Conformados como discos densos:

- ❖ Los discos densos de $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ muestran una superficie menos densa que los de TiO_2 . Los tamaños de grano son homogéneos y de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$.
- ❖ Los discos poseen una densidad elevada, 95%, pero no tanto como en el caso del TiO_2 .
- ❖ La medida del ángulo de contacto sobre la superficie de los discos es de 134.6° , lo que indica una superficie hidrófoba, que como consecuencia tendrá dificultad para la adhesión de proteínas y células.

Bibliografía

1. Carballo-Vila, M., B. Moreno-Burriel, E. Chinarro, J.R. Jurado, N. Casañ-Pastor and J.E. Collazos-Castro, *Titanium oxide as substrate for neural cell growth*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2009. **90**(1): p. 94-105.
2. Zachariah, A., K.V. Baiju, S. Shukla, K.S. Deepa, J. James and K.G.K. Warner, *Synergistic effect in photocatalysis as observed for mixed-phase nanocrystalline titania processed via sol-gel solvent mixing and calcination*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(30): p. 11345-11356.
3. Song, G.B., J.K. Liang, F.S. Liu, T.J. Peng and G.H. Rao, *Preparation and phase transformation of anatase-rutile crystals in metal doped TiO₂/muscovite nanocomposites*. Thin Solid Films, 2005. **491**(1-2): p. 110-116.
4. Teixeira, S., M.A. Rodriguez, P. Pena, A.H. De Aza, S. De Aza, M.P. Ferraz and F.J. Monteiro, *Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering*. Materials Science and Engineering C, 2009. **29**(5): p. 1510-1514.
5. Hayfield, P.C.S., *Development of a New Material Monolithic Ti₄O₇ EBONEX® Ceramic*. Royal Society of Chemistry, 2002 Chapter 2: p. 9-46.
6. Eick, B.M. and J.P. Youngblood, *Carbothermal reduction of metal-oxide powders by synthetic pitch to carbide and nitride ceramics*. Journal of Materials Science, 2009. **44**(5): p. 1159-1171.
7. Chen, G.Z., D.J. Fray and T.W. Farthing, *Direct electrochemical reduction of titanium dioxide to titanium in molten calcium chloride*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 361-364.
8. Veljković, I., D. Poleti, M. Zdujić, L. Karanović and Č. Jovalekić, *Mechanochemical synthesis of nanocrystalline titanium monoxide*. Materials Letters, 2008. **62**(17-18): p. 2769-2771.
9. Hauf, C., R. Kniep and G. Pfaff, *Preparation of various titanium suboxide powders by reduction of TiO₂ with silicon*. Journal of Materials Science, 1999. **34**(6): p. 1287-1292.
10. Segadães, A.M., M.R. Morelli and R.G.A. Kiminami, *Combustion synthesis of aluminium titanate*. Journal of the European Ceramic Society, 1998. **18**(7): p. 771-781.
11. Ainirad, A., M.M. Kashani Motlagh and A. Maghsoudipoor, *A systematic study on the synthesis of Ca, Gd codoped cerium oxide by combustion method*. Journal of Alloys and Compounds, 2011. **509**(5): p. 1505-1510.
12. Dong, Y., S. Hampshire, J.E. Zhou, X. Dong, B. Lin and G. Meng, *Combustion synthesis and characterization of Cu-Sm co-doped CeO₂ electrolytes*. Journal of the European Ceramic Society, 2011. **31**(13): p. 2365-2376.
13. Dong, S., X. Chen, L. Gu, L. Zhang, X. Zhou, Z. Liu, P. Han, H. Xu, J. Yao, X. Zhang, L. Li, C. Shang and G. Cui, *A biocompatible titanium nitride nanorods derived nanostructured electrode for biosensing and bioelectrochemical energy conversion*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(10): p. 4088-4094.
14. Matei, C., D. Berger, S. Stoleriu, D. Neagu and E. Stefan, *Synthesis of ceria-based ceramics by combustion technique*. Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 2010. **12**(7): p. 1524-1529.
15. Chinarro, E., J.R. Jurado and M.T. Colomer, *Synthesis of ceria-based electrolyte nanometric powders by urea-combustion technique*. Journal of the European Ceramic Society, 2007. **27**(13-15): p. 3619-3623.

16. Van Leeuwen, R.A., C.J. Hung, D.R. Kammler and J.A. Switzer, *Optical and electronic transport properties of electrodeposited thallium(III) oxide films*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(41): p. 15247-15252.
17. Reddy, K.M., S.V. Manorama and A.R. Reddy, *Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticles*. Materials Chemistry and Physics, 2003. **78**(1): p. 239-245.
18. Zanchetta, P. and J. Guezennec, *Surface thermodynamics of osteoblasts: Relation between hydrophobicity and bone active biomaterials*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001. **22**(4): p. 301-307.
19. Curtis, A. and m. Dalby, *Chapter 17: Cell response to nanofeatures in biomaterials*. Nombre del Libro. Part II: Cell response and regenerative medicine: p. 431-461.

Capítulo IV

IV Materiales para electrodo en biomedicina

4.1 Introducción

El desarrollo de nuevos materiales para su uso como electrodos en la estimulación y el registro de señales neuronales es una de las áreas de mayor interés en biomedicina: *“Entre las nuevas prótesis y tratamientos que se han empezado a desarrollar para la reparación de lesiones de la médula espinal, infartos cerebrales, deficiencias sensoriales y desordenes neurológicos se encuentra el uso de estimulación eléctrica del tejido nervioso así como el registro de la actividad eléctrica neural. Distintos materiales han sido propuestos como electrodo en este sentido. Tenemos entre los más comunes Pt, IrO y TiN (como recubrimientos). Entre los nuevos materiales emergentes en este campo están polímeros como PEDOT y los nanotubos de carbono”*[1].

En los objetivos de este trabajo se exponen las ideas en las que se inspiró el proyecto. Entre ellas se ha prestado especial atención a la estimulación del crecimiento axonal a través de la estimulación eléctrica. Un buen electrodo para electroestimulación tiene que ser capaz de inyectar carga como carga iónica desde la superficie del electrodo a la del tejido. Este proceso debe evitar que se den reacciones electroquímicas en la superficie del electrodo y en el medio del tejido, ya que

disminuiría la efectividad del electrodo y dañaría el tejido. Por supuesto, la biocompatibilidad del material es una condición esencial para evitar una respuesta inflamatoria que finalizaría en la encapsulación y aislamiento de la superficie del electrodo.

Para cumplir este objetivo se ha planteado el desarrollo de nuevos materiales de electrodo, con una elevada capacidad de almacenamiento de carga, estabilidad química y biocompatibilidad. Uno de los objetivos más perseguidos en el estudio de nuevos materiales para su aplicación como electrodos para ser implantados en el cuerpo humano y electroestimular con fines médicos, es reducir el proceso inflamatorio [2]. Si en cualquier implante es importante reducir el proceso inflamatorio, aquí adquiere un mayor significado. Si el proceso inflamatorio lo que trata es de aislar al agente extraño, en este caso, el electrodo, la superficie del mismo podría quedar aislada del tejido al que pretende electroestimular inhabilitándolo. Además, en el caso de CNS el proceso inflamatorio es mucho más agresivo. Algunas de las estrategia que se han planteado para resolver este problema han sido el empleo de moléculas bioactivas, como agentes antiinflamatorios y el desarrollo de nuevos materiales poliméricos y cerámicos [2]. Por ello, en este trabajo se han propuesto y estudiado dos materiales de naturaleza cerámica dirigidos a la aplicación ya mencionada: Ti_4O_7 y Ti_5O_9 (pertenecientes a la serie de las fases de Magnéli) y TiN. Las propiedades más básicas y esenciales que requiere un electrodo orientado a su uso en estimulación eléctrica en biomedicina son: biocompatibilidad, buena conductividad eléctrica y resistencia a la corrosión.

Por un lado, los compuestos Ti_4O_7 y Ti_5O_9 pertenecientes a la serie de las fases de Magnéli han sido ampliamente estudiados para su uso como electrodo, pero no con fines médicos, y existe una extensa bibliografía de sus propiedades eléctricas y electroquímicas [3-9]. Para ser usado como electrodo en biomedicina, además, es necesario que el material no induzca una reacción inflamatoria crónica en contacto con el tejido. En el Capítulo I de Introducción se proponen los posibles mecanismos por los cuales el TiO_2 es capaz de neutralizar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [10-12] producidos por células inflamatorias como señal desencadenante del proceso inflamatorio. En base a esto, en este trabajo se plantea que los materiales pertenecientes a la serie de Magnéli, al igual que en el caso de TiO_2 , pudieran poseer

dicha capacidad neutralizadora. Esta actividad neutralizadora, o de *scavenging*, para los materiales Ti_4O_7 y Ti_5O_9 será confirmada en los ensayos expuestos en el capítulo V. El actual capítulo dedica el punto 6.2.3 al estudio de las propiedades eléctricas y electroquímicas de los materiales $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ sintetizados durante este trabajo doctoral, y el punto 6.2.4 a la realización de cultivos celulares sobre sustratos de dicha composición y análisis inmunocitoquímicos sobre estos cultivos.

Por otro lado, también se han sintetizado y estudiado cerámicas basadas en el TiN, que ya ha sido propuesto por otros autores como electrodo en biomedicina. Este material ha sido estudiado con anterioridad en esta aplicación concreta preparado cómo capa delgada y presenta las siguientes propiedades: biocompatibilidad, es un compuesto químicamente estable y su mecanismo de conducción es de tipo metálico [13]. En el Capítulo I de Introducción también se explican los mecanismos mediante los cuales los electrodos realizan la inyección de carga en los tejidos. Según dicha bibliografía, el mecanismo que siguen los materiales de composición TiN en capa delgada, es de tipo capacitivo empleado la doble capa eléctrica formada en la interfase electrodo-electrolito [14, 15]. Para obtener elevadas capacidades de carga-inyección (Q_{inj}), es necesario conseguir superficies con una gran rugosidad que haga que el área electroquímica (ESA) aumente en comparación al área geométrica (GSA) del electrodo [1]. Para conseguir microelectrodos (bajas GSA) donde ESAs sean elevadas se han realizado recubrimientos obtenidos por la técnica de deposición por *sputtering*, dando lugar a superficies de elevada porosidad y generando una geometría fractal. Existen datos publicados de capacidad de inyección de carga de 0.9 mC cm^{-2} (ancho del pulso 0.5 ms) para un electrodo de TiN con una superficie de $4000 \mu\text{m}^2$ [16]. Estos valores de capacidad de inyección de carga son inferiores a los obtenidos para otros recubrimientos cuyo mecanismo de inyección es de tipo faradaico como el del IrO_x . La ventaja de este tipo de electrodos es que evitan que tengan lugar reacciones irreversibles con el medio, puesto que la ventana de potencial en la que el electrodo puede trabajar sin que se dé la hidrólisis del agua se ensancha, desde los -0.9V hasta los 0.9V (versus Ag|AgCl), en comparación a electrodos de Pt o IrO_x , cuyo mecanismo de inyección de carga, tipo faradaico. Este último implica reacciones redox, en la interfaz superficie del electrodo-medio, cambiando la naturaleza de ambos en el proceso. El TiN obtenido con una geometría fractal ha sido empleado en electrodos usados en marcapasos [17].

La porosidad de la superficie de los electrodos tiene mucha importancia, ya que un aumento de la misma permite conseguir valores elevados de ESA/GSA, lo que significa mayores valores de capacidad para almacenamiento de carga (medida mediante CV a bajas velocidades de barrido). Sin embargo, a velocidades de barrido altas y elevadas densidades de corriente el acceso a la carga depende de la resistencia impuesta por la porosidad [18]. Para los electrodos con una gran área superficial la resistencia del poro impone una dificultad geométrica para aumentar la capacidad de inyección de carga. La resistencia del electrolito y la capacitancia en la superficie que limita el volumen del poro, dan lugar a la aparición de una línea de retardo con una constante de tiempo que dependerá de la geometría del poro. La consecuencia de esta constante de tiempo es que la ESA total del electrodo no se encuentra accesible a la densidad de corriente que tiene lugar durante la estimulación. Los poros de geometrías estrechas y profundas provocan constantes de tiempo elevadas y sus capacidades de carga-inyección son más inaccesibles en comparación a los más superficiales. Otras ventajas de los electrodos formados por recubrimientos de TiN son la estabilidad química y mecánica, que posee de manera intrínseca este material. Además, es un compuesto no sensible a la deshidratación, puede ser esterilizado mediante métodos comunes y puede ser almacenado tanto en medio húmedo como seco. Todo ello hace que sea fácil su manejo puesto que no requiere un cuidado especial [1]. La bibliografía también muestra que los materiales de TiN han sido estudiados como sustratos para cultivos de neuronas. Las diferentes morfologías y químicas superficiales, debidas a los distintos métodos de obtención, suponen una diferente repuesta celular [19].

La novedad que introduce este trabajo de investigación para el uso de TiN como electrodo de estimulación aplicado en medicina, es la naturaleza del material. Mientras que en trabajos anteriores el compuesto se presenta en recubrimientos, en este trabajo de investigación el compuesto se sintetiza a partir de TiO_2 , conformado en polvos y muestras densas, por el método de nitruración mediante tratamiento térmico en atmósfera de amoníaco. Con ello, se espera conseguir un electrodo con mejores propiedades mecánicas a las mostradas por los recubrimientos, sin perder las propiedades químicas y electroquímicas intrínsecas del compuesto.

4.2 Síntesis y caracterización de materiales Ti_4O_7 y Ti_5O_9

Como se ha expuesto en el Capítulo II, tanto las muestras en polvo como los discos de $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ se obtienen a partir de la reducción de los materiales de TiO_2 mediante tratamiento térmico a 1400°C en N_2/H_2 .

La elección de este tratamiento, conlleva un estudio previo de optimización del tratamiento térmico para la obtención de las mismas, evitando la presencia de TiO_2 como fase secundaria. Para ello, se trabajó con dos tratamientos térmicos diferentes recogidos en la **Tabla 4.1**:

Tabla 4.1 Condiciones de síntesis empleadas.

Temperatura	Tiempo (Plateau)	Velocidad subida/bajada
1400°C	3 h	$5^\circ\text{C}/\text{min}$
1400°C	12 h	$5^\circ\text{C}/\text{min}$

4.2.1 Caracterización química

Las primeras reducciones que se llevadas a cabo se realizaron sobre discos densos de TiO_2 y tenían una duración de 3h a 1400°C , pero tras el tratamiento, los difractogramas obtenidos por DRX sólo mostraban TiO_2 en fase rutilo, indicando que el tiempo o la temperatura de tratamiento eran insuficientes para obtener las fases deseadas. El tiempo de tratamiento se aumentó hasta 12h a 1400°C de temperatura y, fueron a estas condiciones con las que se consiguió un material cuyos análisis por DRX revelan la existencia de las fases de Magnéli que se pretendían obtener. En los difractogramas aparece una mezcla de fases $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_6\text{O}_{11}$ (**Fig. 4.1 a**).

Durante el proceso de reducción se produce un aumento de la presión parcial de O_2 , debido a la acumulación de este compuesto gaseoso que se desprendía de la muestra en el proceso de reducción. Ello indujo a realizar un estudio basado en la cantidad de muestra y la manera de distribuirla en el horno, que demostró que estos parámetros influían de manera definitiva en el grado de reducción del material. Controlando la cantidad de muestra introducida en el horno, manteniendo las mismas condiciones de síntesis ($1400^\circ\text{C}/12\text{ h}$, en N_2/H_2 (90:10)), se llegaron a obtener

materiales cuya DRX mostraba una única fase mayoritaria Ti_5O_9 (**Fig. 4.1 b**) o incluso una mezcla de fases $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ (**Fig. 4.2**).

Tras un cambio en el diseño del horno de tratamiento, que implicó una mejor ubicación de la entrada de los gases en el interior de la cámara, el flujo de los mismos incidía más directamente sobre la muestra, y se obtuvieron materiales que compuestos por Ti_4O_7 como fase mayoritaria (**Fig. 4.1 c**).

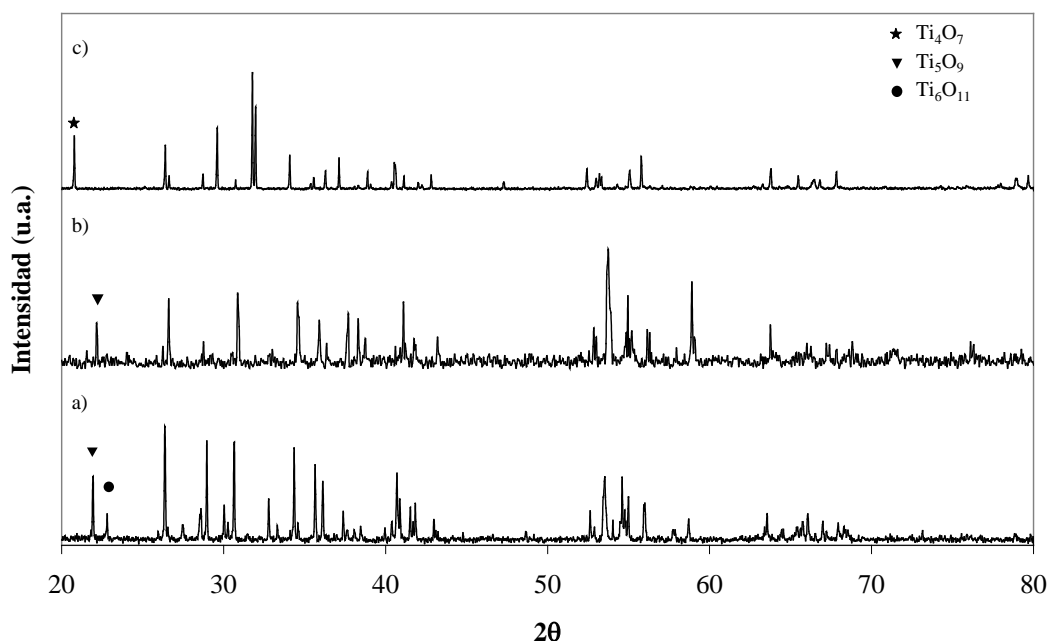
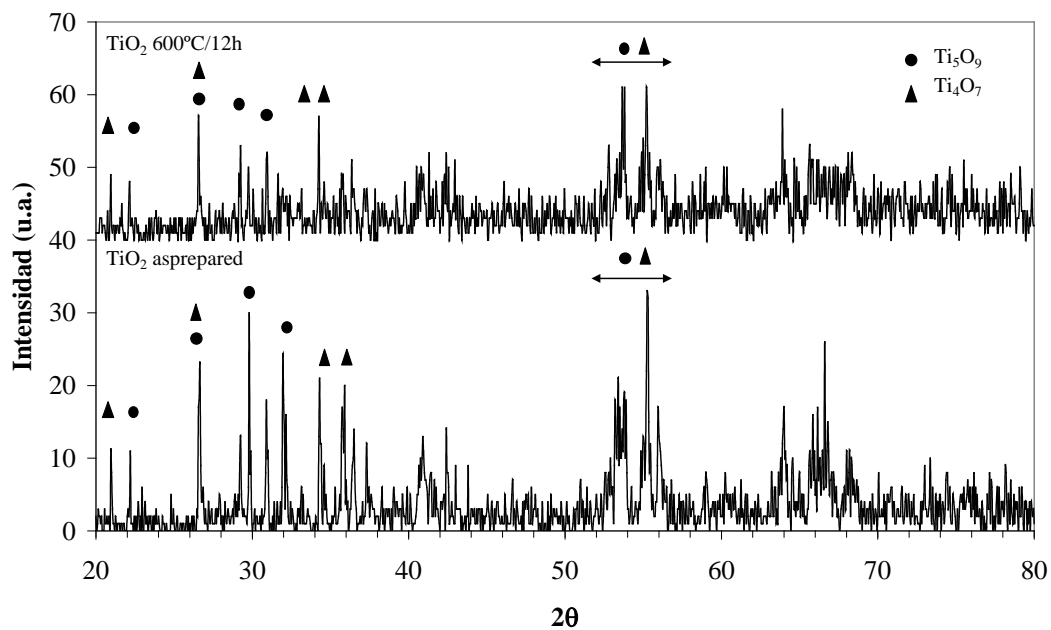
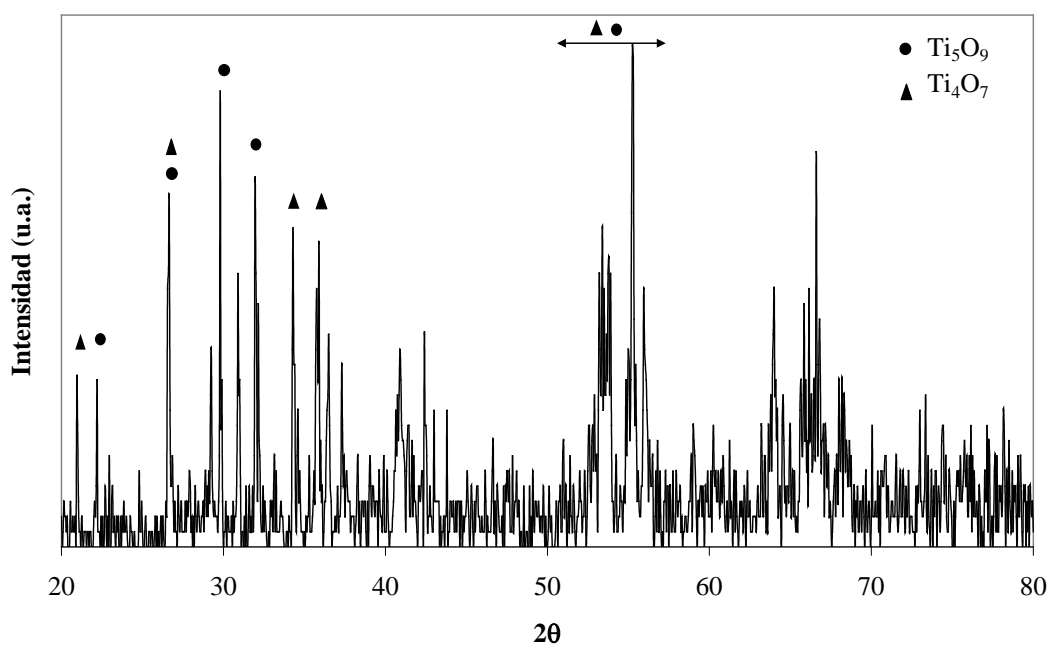


Fig. 4.1 DRX de un disco denso de TiO_2 tras un tratamiento de reducción a $1400^\circ\text{C}/12\text{h}$ en $\text{N}_2:\text{H}_2$ a) obteniendo mezcla de fases $\text{Ti}_5\text{O}_9/\text{Ti}_6\text{O}_{11}$ b) fase mayoritaria Ti_5O_9 tras controlar la P_{O_2} y c) fase mayoritaria Ti_4O_7 tras mejorar la dirección del flujo de gases en el horno de atmósfera controlada.

En cualquiera de las formas en que se encuentre conformado el material, como polvos *recién preparados*, polvos *calcinados*, discos densos o estructuras tridimensionales, se obtienen materiales en el mismo grado de reducción siempre que se mantengan las mismas condiciones (**Fig. 4.2**).



(a)



(b)

Fig. 4.2 DRX tras un tratamiento de reducción a 1400°C/12h en $\text{N}_2:\text{H}_2$ de (a) muestras en polvo de TiO_2 recién preparado y calcinado y (b) de una estructura tridimensional de TiO_2 (sinterizada a / h). Las señales de los espectros son características de una mezcla de fases $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$.

En resumen, podemos decir que ha habido una evolución en la síntesis de materiales reducidos, consiguiendo una reducción más eficiente con el control de los distintos parámetros. Esta evolución se producía en paralelo a nuestro estudio del material y los ensayos dirigidos a su aplicación como electrodo en biomedicina. Mientras que la caracterización y el estudio de la actividad *scavenging* se realizó en el material que poseía una fase mayoritaria Ti_5O_9 , los estudios electroquímicos y de evaluación de campo eléctrico sobre cultivos *Xenopus*, se realizó con el material que poseía una fase mayoritaria Ti_4O_7 (**Tabla 4.2**). Ambas fases presentan una elevada conductividad eléctrica teórica (**Fig. 4.3**). Ti_5O_9 además, es una de las fases de la serie de Magnéli menos estudiadas.

Tabla 4.2 Resumen de los ensayos realizados con cada uno de los materiales

Materiales	Ensayos
Ti_5O_9	Caracterización
	Evaluación <i>scavenging</i> Estudios electroquímicos
Ti_4O_7	Aplicación EF

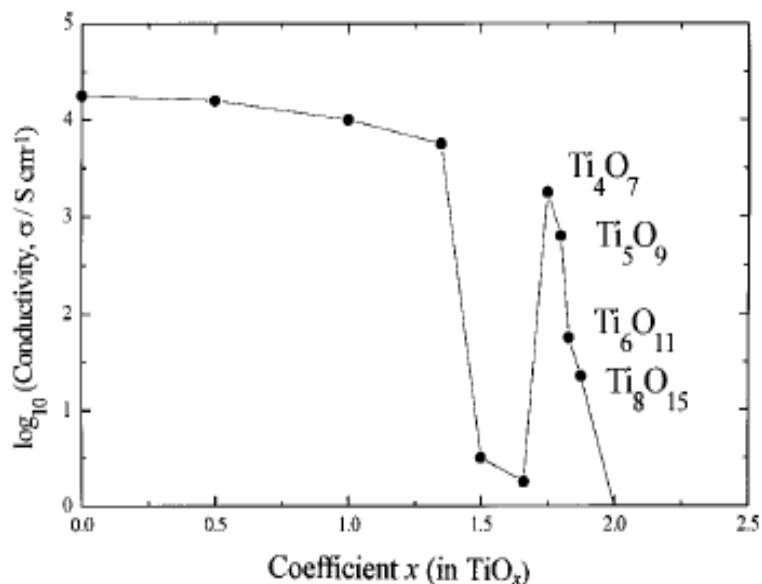


Fig. 4.3 Conductividad eléctrica de diferentes composiciones sub-estequiométricas de óxido de titanio entre Ti y TiO_2 [4].

La composición química de dicho material, se estudió mediante cálculos indirectos por medio de Fluorescencia de Rayos X (XRF) y análisis de oxígeno. Para ello se analizaron el material en polvo compuesto por Ti_5O_9 como fase cristalina mayoritaria. Este análisis confirmó la alta pureza de la muestra, que estaba compuesta por Ti^{3+} como Ti_5O_9 en un 90,2% en peso y el resto formando parte de otras fases de la serie de Magnéli.

El análisis de la superficie de la muestra es muy importante, ya que las interacciones que van a tener lugar entre el material y los medios biológicos o incluso las células, van a ser siempre de tipo superficial. Para este análisis, se empleó la Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), a partir de los espectros obtenidos (**Fig.4.4**) se puede determinar la existencia, en superficie, de Ti en su mayoría en estado de oxidación +3 y en una coordinación octaédrica (bandas con energía de ligadura de 458 y 464 eV) (**Fig. 4.4 a**). Existe un pequeño porcentaje de Ti que permanece en estado de oxidación +4 en coordinación tetraédrica y asociada a la presencia de agua e hidroxilos ligados a la superficie (bandas con energía de ligadura de 461 y 466 eV). Las conclusiones alcanzadas para el espectro de Ti_{2p} quedan confirmadas con las obtenidas del espectro de O_{1s} (**Fig. 4.4 b**), donde se pueden observar tres componentes distintas a 529, 532 y 534 eV que se corresponden al oxígeno unido al Ti formando un óxido metálico, grupos -OH unidos a Ti en superficie y H_2O adsorbida en superficie, respectivamente. Precisamente esta mezcla de estados de oxidación del titanio, se verá que tiene relación con la conductividad eléctrica y el mecanismo de conducción del material.

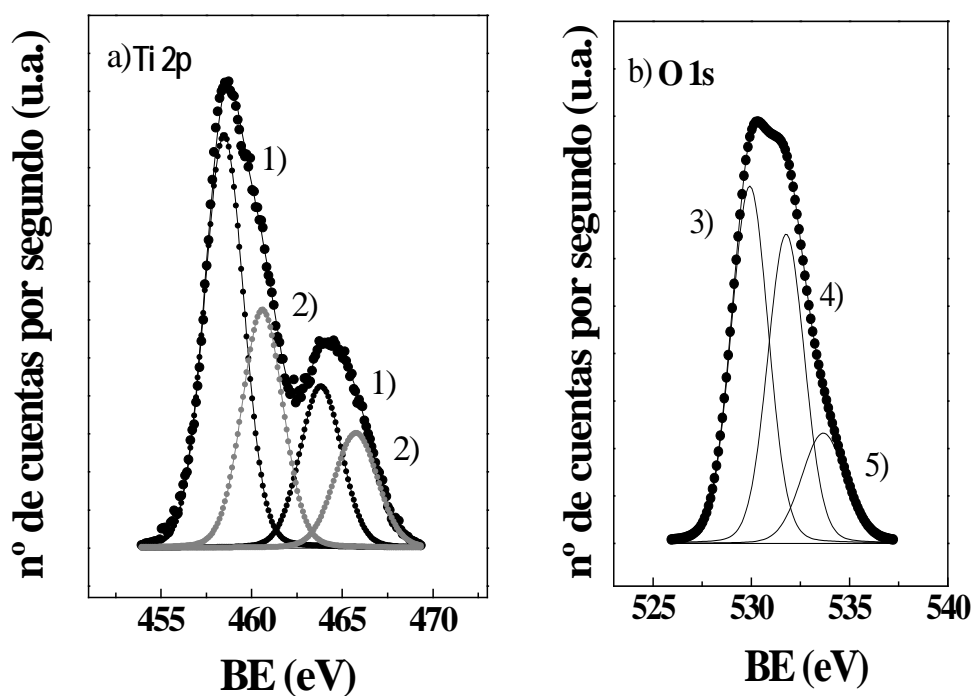


Fig 4.4 Espectros de XPS de una muestra de Ti_5O_9 en polvo, a) espectro de $\text{Ti}2p$ (donde 1) corresponde a Ti^{3+} en coordinación octaédrica 2) corresponde a Ti^{4+} en coordinación tetraédrica) y b) espectro $\text{O}1s$, donde 3) corresponde a oxígeno asociado a Titanio reducido 4) corresponde a $-\text{OH}$ y 5) corresponde a agua absorbida).

Por último, el análisis térmico mediante ATD-TG realizado en aire, de una muestra de la misma composición a la anterior, muestra una secuencia de picos exotérmicos acompañados de aumentos en la masa. Esto se traduce en la incorporación de oxígeno a la muestra con el aumento de la temperatura. Pero esta incorporación no se produce de una manera aleatoria sino organizada, donde el material va pasando por la formación de cada una de la fases de la serie de Magnéli hasta llegar a la formación de TiO_2 estequiométrico en fase rutilo (**Fig. 4.5**).

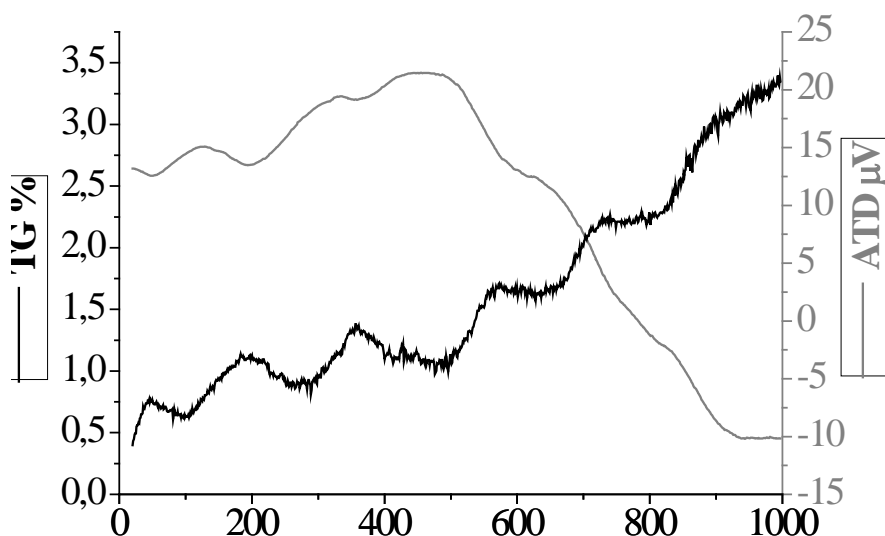


Fig. 4.5 Curvas de ATD-TG de una muestra reducida, Ti_5O_9 , en polvo.

4.2.2 Caracterización morfológica y microestructural de las muestras reducidas

Durante el proceso de reducción además de los cambios de fases y químicos se observan otros cambios de tipo microestructural.

Así, el tamaño de partícula de los polvos de materiales de la serie de Magnéli, presenta un aumento con la consiguiente reducción de su superficie específica (**Tabla 4.3**). Este aumento ha sido observado para aquellos materiales de la serie de Magnéli obtenidos a partir de polvo de TiO_2 , tanto *recién preparado* como los calcinado ($600^\circ\text{C}/12\text{h}$). En ambos casos, la superficie específica del material disminuye hasta un valor estimado, para los polvos reducidos, en $0.1 \text{ m}^2/\text{gr}$. Esta tendencia es lógica teniendo en cuenta el tratamiento térmico a que han sido sometidos los materiales.

Tabla 4.3 Superficie específica de los polvos de TiO_2 recién preparados y calcinados comparados con la de estos mismos tras el proceso de reducción en el que obtenemos Ti_5O_9 .

Muestra	Superficie específica m^2/g
TiO_2 recién preparado	250
TiO_2 calcinado	10
Ti_5O_9	≤ 0.1

En el caso de los discos, se observa una disminución de la densidad relativa desde el 98% de los discos densos de TiO_2 , hasta un 93% para los discos reducidos a Ti_5O_9 . Estos datos se explican en base a la pérdida de oxígeno que tiene lugar durante el proceso de reducción. Esta pérdida de oxígeno se manifiesta en la superficie del material en forma de porosidad de tipo cerrado, con una distribución de tamaño de poro entre 10-20 μm (**Fig. 4.6**). Sin embargo, en la micrografía de MEB (**Fig. 4.7**) de la fractura de un disco reducido se comprueba cómo dicha porosidad decrece al profundizar en la muestra, lo cual es razonable, ya que durante la reducción el oxígeno abandona la muestra empezando por las parte más externa que es la más expuesta a la atmósfera reductora; y al tratarse de una muestra densa el desplazamiento del oxígeno se va produciendo desde las capas más internas hacia las externas de forma progresiva, de modo que la parte externa será la que sufra un reducción mayor. Esto también se corrobora porque el ratio O/Ti aumenta a medida que se penetra en el interior de la muestra, lo que indica que el proceso de reducción que se ha dado es un proceso fundamentalmente superficial. Con esto se vuelve a demostrar que el tiempo de tratamiento es un factor fundamental en este proceso, y el que se ha empleado es bajo para el caso de las muestras densas si se mantienen el resto de las condiciones (1400C y gas $\text{N}_2:\text{H}_2$ 90:10). En la superficie, la alta densidad de porosidad hace que algunos poros queden interconectados (**Fig. 4.6 b**)

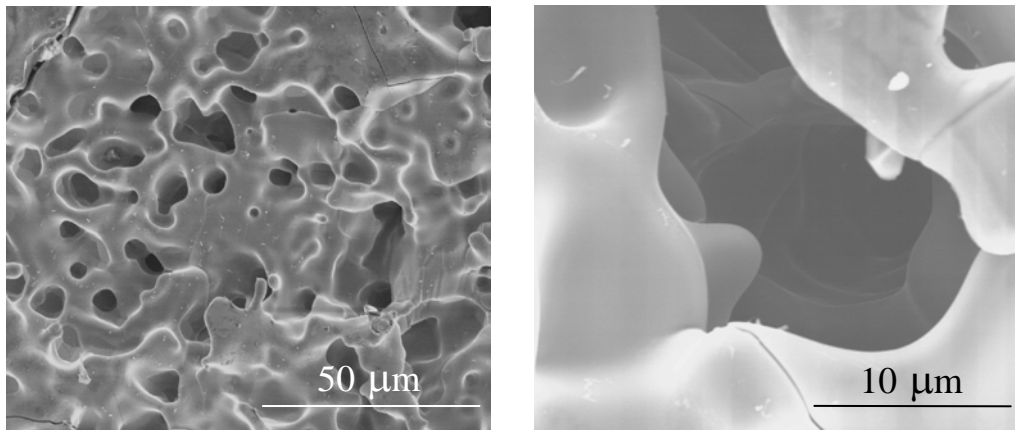


Fig. 4.6 Micrográficas de MEB de la superficie de un disco de Ti_5O_9 . (a) Visión general de la superficie (b) Aumento de uno de los poros creados durante el proceso de reducción e interconectado a otros.

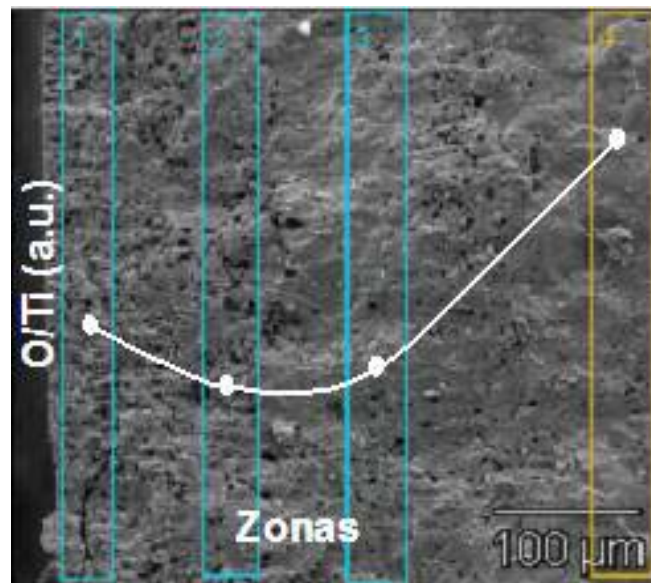


Fig. 4.7 Micrografía MEB de la zona de fractura de un disco denso de TiO_2 reducido a Ti_5O_9 .

La morfología de la superficie de los discos reducidos también fue estudiada mediante AFM. Tanto la imágenes mostradas en las **Fig. 4.8 A y B** como los perfiles topográficos obtenidos de los tramos señalados c, d y e sobre la **Fig. 4.8 A**, los cuales se muestran en las **Fig. 4.8 C, D y E** respectivamente, también desvelan una superficie de elevada rugosidad. La superficie muestra una distribución de tamaño de granos bastante homogénea, siendo la mayoría granos de un tamaño de aproximadamente $5\mu\text{m}$. Los valles que se observan en los perfiles **afipogr**

realizados en las zonas de contacto de los bordes de grano poseen elevadas profundidades de hasta 1 μm , **Fig. 4.8 C y E**.

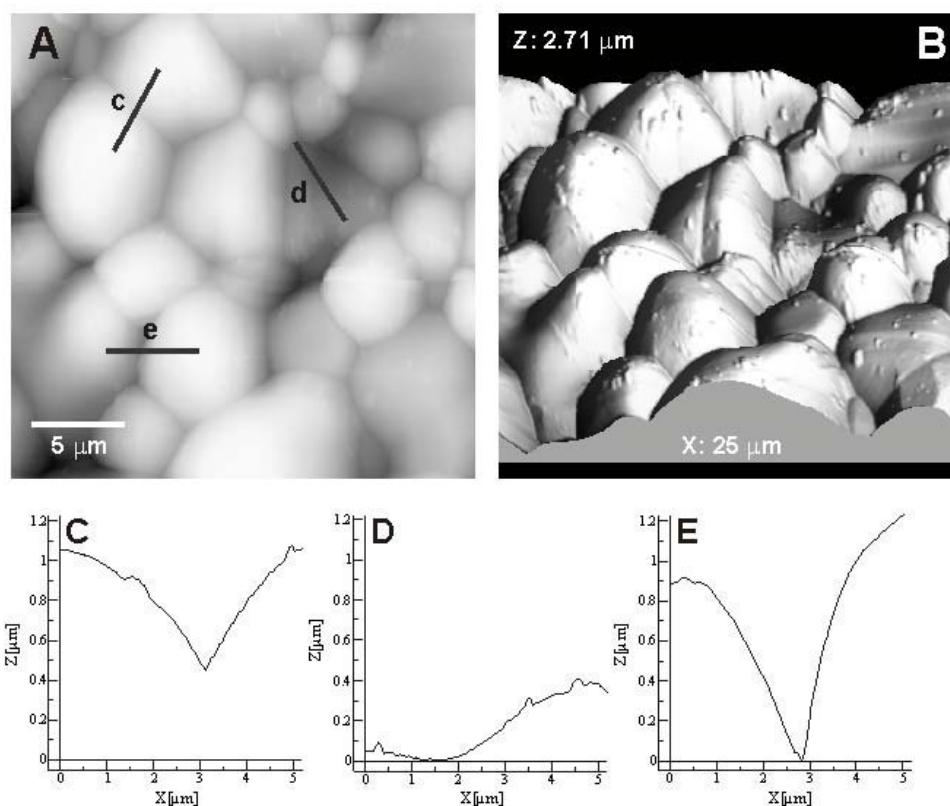


Fig. 4.8 Estudio por AFM del perfil topográfico de la superficie de un disco denso de TiO_2 reducido a Ti_5O_9 . A) Vista en 2D de la superficie, B) Vista en 3D de la misma superficie. En ambos casos la altura está representada en la escala de los grises, considerando el punto más oscuro cero y el más brillante alcanza un máximo de 2,7 μm sobre el cero. C), D) y E) corresponden respectivamente a las medidas de los perfiles topográficos para los segmentos señalados en A como C, D y E.

La hidrofiliidad de las muestras es un parámetro importante a tener en cuenta de cara al estudio de la interacción de este material con los medios y fluidos fisiológicos en que se encuentran las células. Sin embargo, el ángulo de contacto de estas superficies no pudo ser medido ya que, debido a la porosidad, la gota de agua era absorbida en el momento en que era depositada en superficie.

Se llevó a cabo el estudio de posibilidad de preparación de estructuras 3D reducidas en forma de tubos o *Conduits* y esponjas o *Scaffolds*. Tanto tubos como esponjas de TiO₂ fueron sometidos al tratamiento de reducción mencionado anteriormente, y las morfologías de los materiales así obtenidos estudiadas en MEB.

En el caso de los tubos, *conduits*, se observa cómo después del tratamiento de reducción, es posible obtener estructuras manejables, formadas por un canal central de 1250µm de diámetro y paredes de 500 micras de espesor. En la zona de fractura (**Fig. 4.9 a y b**), se observa una alta porosidad de tipo cerrado, cuyas medidas acogen un amplio rango dentro de las 10 a 20 micras, con zonas donde los poros coalescen generando estructuras mucho mayores (> 250 micras). En la superficie, el tamaño de los poros es más homogéneo (≈10µm-20µm) (**Fig. 4.9 c y d**). Macroscópicamente, se observa un alto número de grietas en la estructura, y además presenta baja resistencia mecánica.

En el caso de las esponjas, *scaffolds*, se advierte, por un lado una porosidad de tipo interconectado y dimensiones homogéneas de los poros, en el rango de las micras (≈ 300µm) (**Fig. 4.10 a y b**). Y por otro una porosidad cerrada, tanto en la zona de fractura como en la superficie, con valores de ≈5µ (**Fig. 4.10 c y d**). También en este caso existen numerosas grietas y una baja resistencia mecánica de las estructuras.

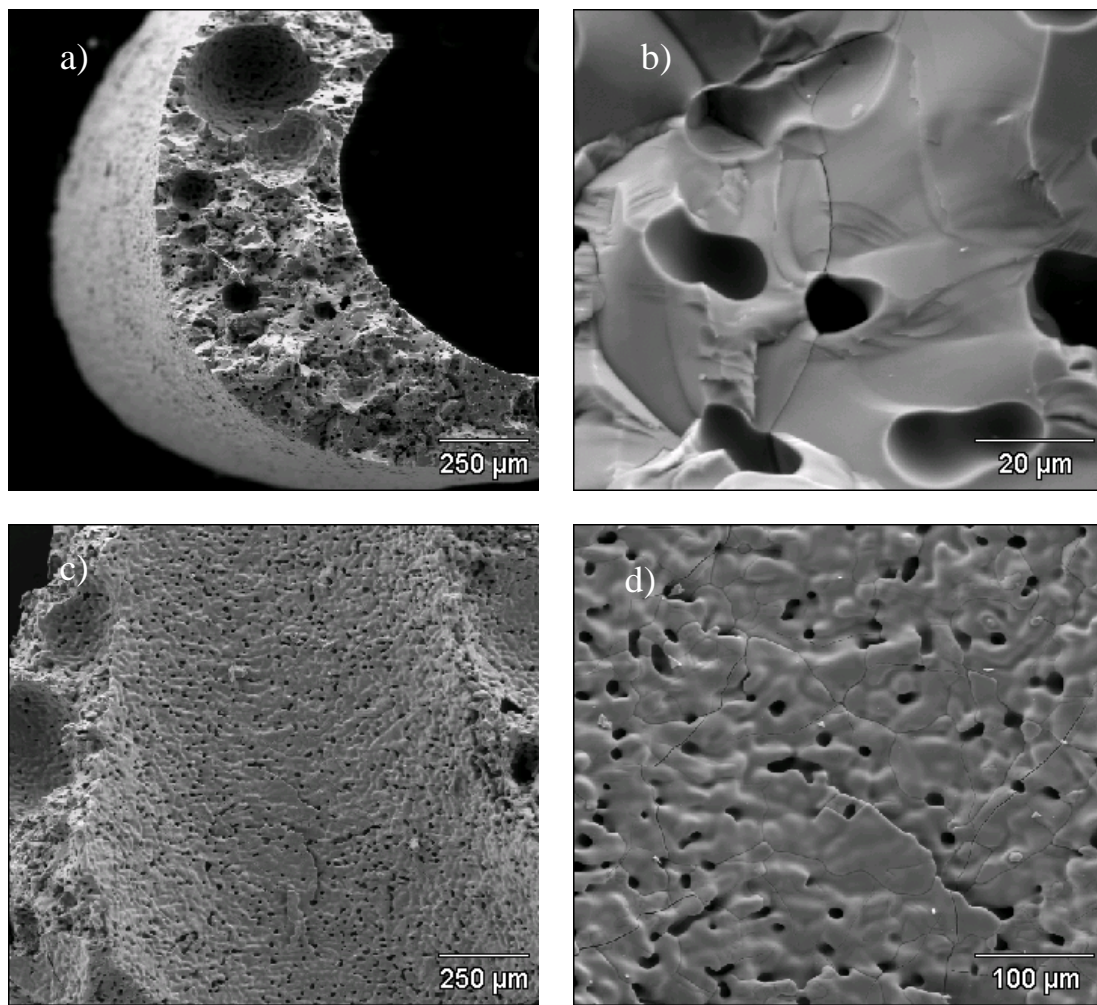


Fig. 4.9 MEB de estructuras 3-D conformadas como semi- tubos o semi-*conduits* de Ti_5O_9 ; a) y b) de un zona de fractura, c) y d) de la superficie cóncava de la parte interior del tubo.

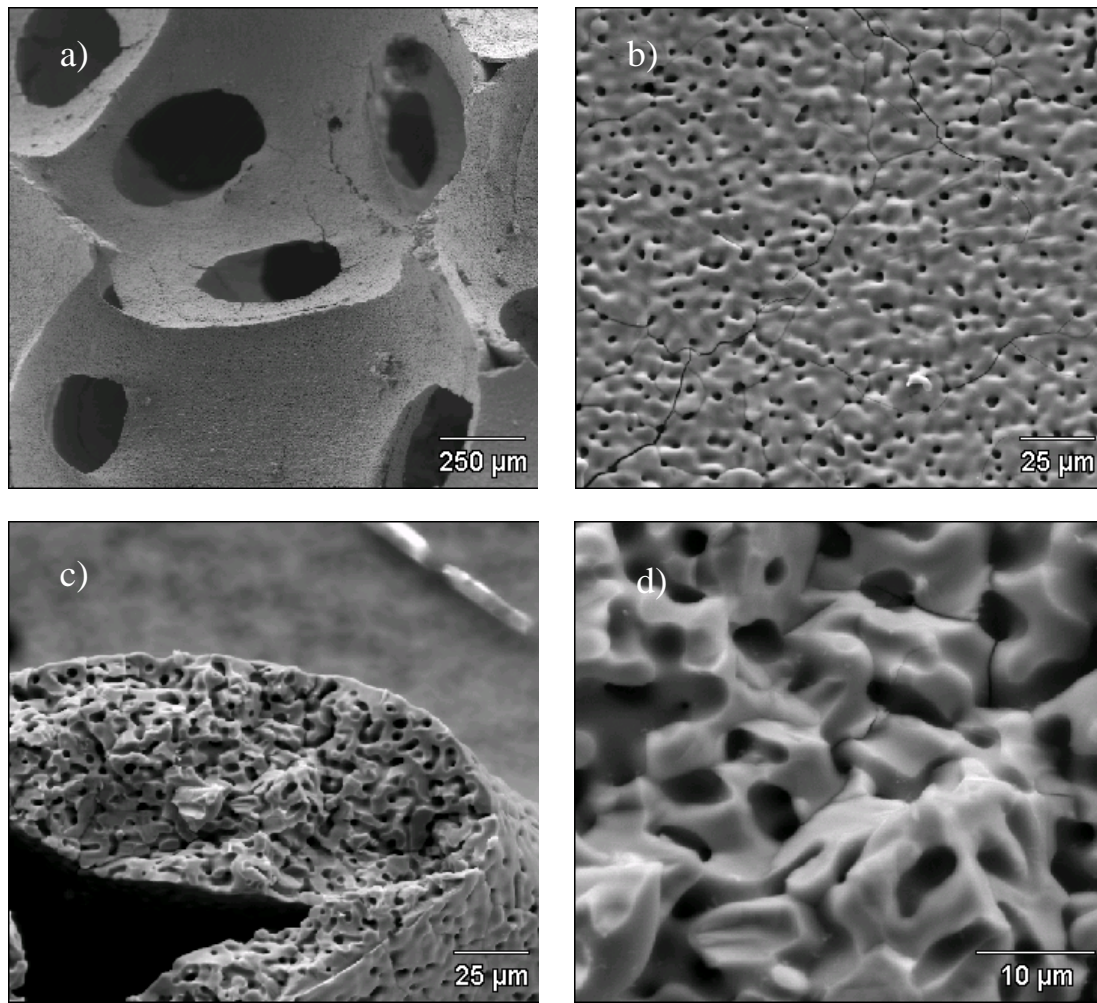


Fig. 4.10 MEB de una estructuras 3-D conformada como esponja o *scaffold* de Ti_5O_9 ; a) plano general de su porosidad interconectada b) una zona de superficie, c) y d) una zona de fractura

4.2.3. Caracterización eléctrica y electroquímica

El estudio eléctrico y electroquímico del material sintetizado es muy importante para determinar su estabilidad electroquímica en las condiciones de operación y la posibilidad de que puedan actuar como electrodos de estimulación con unas prestaciones semejantes a las de los materiales comerciales. El primer estudio eléctrico se encaminó a conocer la conductividad eléctrica de los materiales estudiados, para ello se realizaron medidas empleando el método de las 4 puntas en corriente continua (DC) (**Fig. 4.11**). La muestra empleada fue un disco de Ti_5O_9 . Este

método se eligió en base al elevado carácter conductor de la muestra, evaluado de manera preliminar mediante un multímetro, con el que se detectaron resistencias de entre 5 a 20Ω en los distintos discos que se obtienen de cada hornada.

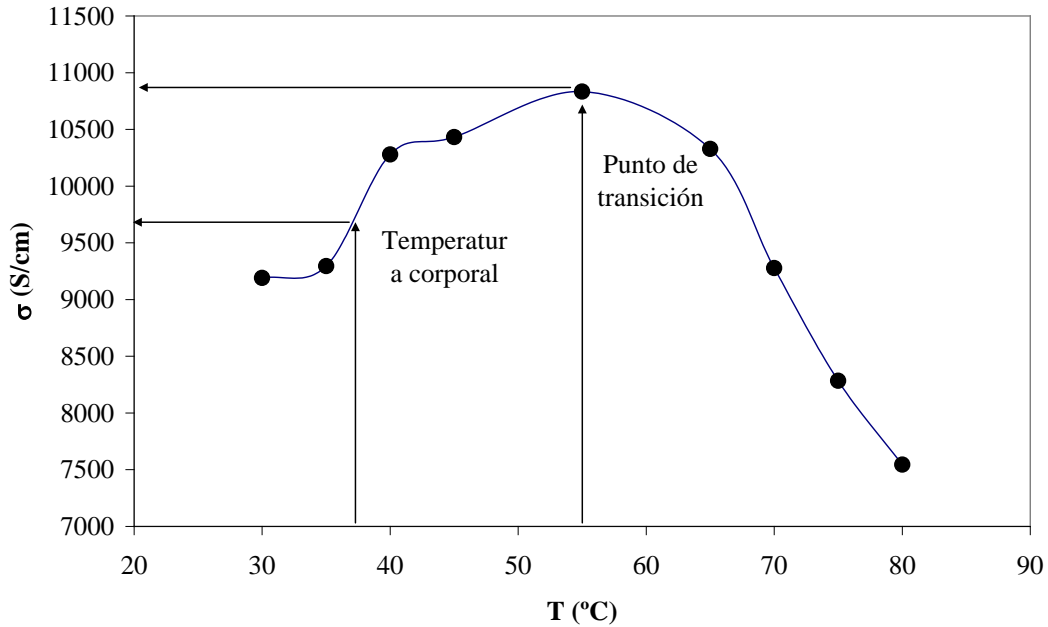


Fig. 4.11 Conductividad eléctrica de un disco reducido a Ti_5O_9 medido por el método de las cuatro puntas en DC.

Los resultados obtenidos muestran el comportamiento eléctrico típico de las fases de la serie de Magnéli, con un cambio de mecanismo de conducción semiconductor-metal a 60°C , donde se obtiene la conductividad máxima, de 10833 S/cm. A 37°C , temperatura corporal, y por tanto, temperatura de trabajo de nuestros electrodos en la aplicación a que se pretenden destinar, la conductividad es > 9500 S/cm. Esta conductividad supera a los valores mostrados en la literatura, donde la para la fase más conductiva, Ti_4O_7 , es de 1500 S/cm la conductividad de un monocristal [4]. El mecanismo de conductividad eléctrica del material es de tipo “salto electrónico” y se debe a la presencia de electrones generados por la coexistencia de dos estados de oxidación del titanio, Ti^{3+} y Ti^{4+} .

Como ya se indicó en la introducción, uno de los problemas más comunes en electroestimulación son las reacciones irreversibles producidas en la superficie del electrodo o generadas en el medio circundante al mismo, como consecuencia de los potenciales alcanzados. Por lo tanto, para estudiar la estabilidad del material en su

aplicación como electrodo se realizaron estudios de voltametría cíclica, según se explica en el Capítulo II, empleando una pastilla de Ti_4O_7 o Ti_5O_9 , según el ensayo, como electrodo de trabajo. Los medios en que se realizaron dichas voltametrías son medios que tratan de simular el medio fisiológico, por un lado medio de fosfato tamponado (Phosphate Buffer Solution, PBS) y una disolución de NaCl con dos concentraciones diferentes 0.9 g/l (concentración fisiológica) y otra que multiplica por diez esta concentración, de 9 g/l. . En la **Fig. 4.12** se muestra la voltametría cíclica realizada en NaCl 0.9 g/l, que no muestra ningún tipo de reacción del electrodo de trabajo (Ti_5O_9) en el medio en el intervalo de medida establecido entre -3V y 3V. Los EF máximos que se llegan a aplicar en este trabajo de investigación para electroestimular los cultivos celulares, son de 150 mV/mm, lo cual, significa que cuando se trabaje con muestras de TiO_2 ($\varnothing \approx 1,5\text{-}2\text{cm}$), los potenciales aplicados serán de 3V. Aproximadamente a -1V se observa la formación de un hombro, el cual se aprecia más nítidamente, con el paso de los escaneos.

Cuando la concentración de NaCl se lleva hasta los 9 gr/l, es decir, se multiplica por diez la concentración fisiológica, si se puede apreciar como el voltamograma cambia drásticamente aumentando su capacidad y mostrando picos de oxidación de especies. El cambio en la corriente positiva es asociado a un elevado efecto de la concentración de Na^+ , que se incorpora al electrodo desde el electrolito. Tras el experimento se ha observado una ligera variación en el color de la superficie del electrodo, pasando de negro a azul oscuro, lo cual, posiblemente sea debido a la oxidación que se detecta en el voltamograma (**Fig. 4.13**). Dicha oxidación, consecuencia de una compensación de cargas, queda ilustrada en el espectro en una señal que se compone a su vez de dos, una a -0,5V y otra a -1 V. La señal obtenida a -0.5 V puede ser comparada con la obtenida por Smith y col. [4]. Estos autores encontraron señales entre -0.5 y 1V, también débilmente definidas, que atribuyeron a cambios en el estado de oxidación del titanio en superficie, aunque estos autores encontraron una corriente menor. Por otro lado, la señal obtenida a -1V coincide con las obtenidas por otros autores Zheng Chen y col. [20] quienes asocian las señales obtenidas a estos potenciales a fases oxigenadas de titanio, donde el oxígeno se encuentra disuelto en el metal.

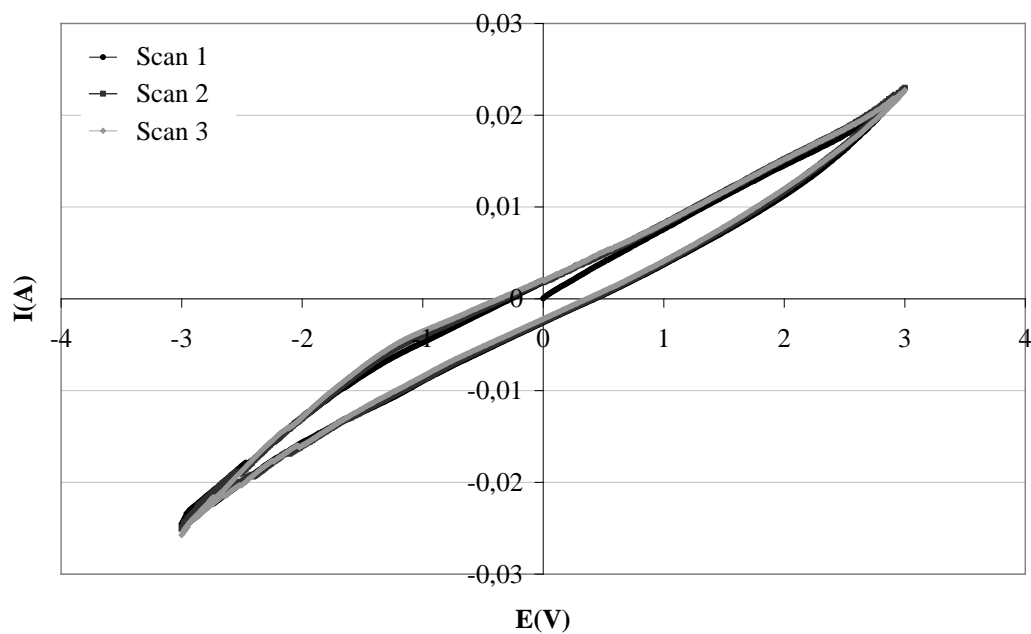


Fig. 4.12 VC con Ti_5O_9 como electrodo de trabajo, lamina de Pt como contraelectrodo y electrodo de Ag/AgCl como referencia, en medio NaCl 0,9 g/l.
Rango de voltajes de 3V a -3V y 100 mV/s.

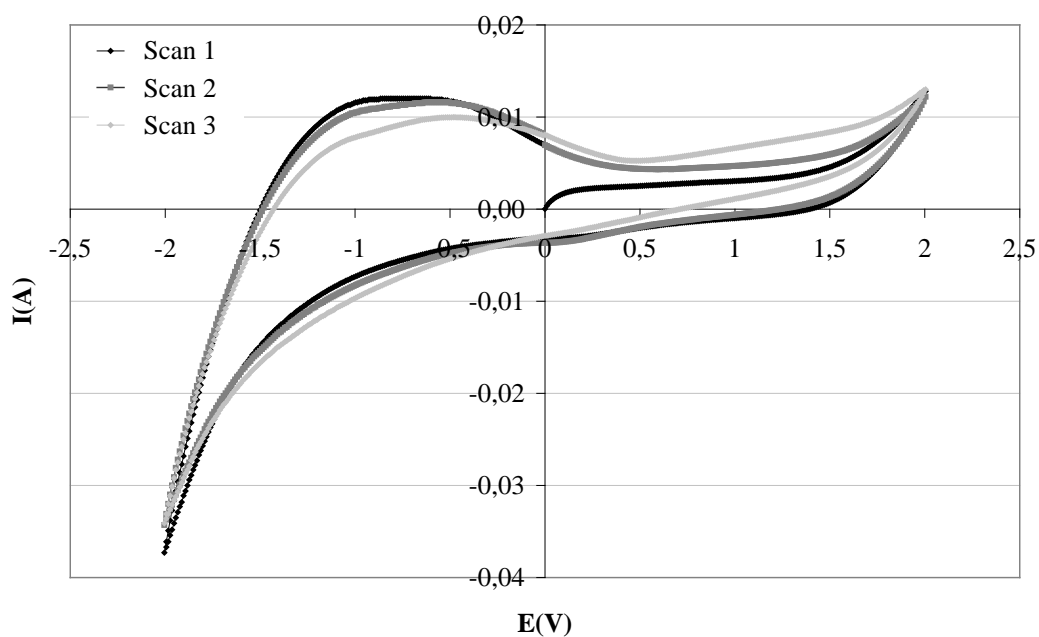


Fig. 4.13 VC con Ti_5O_9 como electrodo de trabajo, lamina de Pt como contraelectrodo y electrodo de Ag/AgCl como referencia, en medio NaCl 9 g/l.
Intervalo de voltajes de 2V a -2V y 100 mV/s.

Para que un material sea usado como electrodo en electroestimulación es interesante que no se produzcan reacciones de oxidación-reducción durante la estimulación. Por ello, el método de inyección de carga mediante el mecanismo de la doble capa seguido por materiales como el TiN como recubrimientos es interesante. Como ya se ha indicado en la introducción apoyada en bibliografía este material dispone de una amplia ventana de potenciales en la que no tienen lugar reacciones de hidrólisis del agua [1]. Además, una baja impedancia y una elevada capacidad de almacenamiento de carga sugieren una mejor eficiencia del electrodo para electroestimular [16]. La evaluación de estas propiedades se realiza mediante VC, siguiendo el protocolo mostrado en la bibliografía donde se registra un barrido de potenciales entre -0,6 a 0,8 V en una disolución de PBS 0,01M [1], pero en nuestro caso usando el material reducido, que en estos ensayos es Ti_4O_7 , como electrodo de trabajo. En la **Fig. 4.14** muestra que el Ti_4O_7 , usado como electrodo de trabajo en un electrolito de PBS, registra un voltamograma de forma aplanada que no muestra ninguna señal que indique que haya tenido lugar reacción alguna de oxidación o reducción. Además, presenta una capacidad de carga mucho mayor que con el NaCl de electrolito en este rango de potencial. Esto se traduce en que el material sigue un mecanismo de inyección de carga capacitivo a través de la doble capa. La capacidad de almacenamiento de carga calculada a partir de la medida del área encerrada por el voltamograma en la zona catódica, es de 77.3 mC/cm^2 . Dicho valor es dos órdenes de magnitud superior al mostrado en materiales que siguen este mismo mecanismo (*TiN sputtered film* $250 \text{ } \mu\text{C/cm}^2$) [1] y un orden de magnitud superior al de materiales que siguen un mecanismo de inyección de carga de tipo Faradaico (Pt $5 \text{ } \mu\text{C/cm}^2$ y SIROF 2.8 mC/cm^2) [1]. Por otro lado, en la **Fig. 4.15** se puede observar una VC registrada en las mismas condiciones pero cuyo barrido de potencia recoge desde -1,5 a 1,5 V. De esta manera se estudia la amplitud de la ventana de potenciales en las que se puede trabajar con este electrodo sin que una reacción de hidrólisis tenga lugar. Mientras que a valores de potencial positivos no se encuentran señales que muestren que ha tenido lugar alguna reacción, a -1V, se observa la formación de dos hombros, señales que indica una reducción oxidación en la superficie del electrodo. Esta señal, coincide de nuevo, como ocurría con la VC llevadas a cabo en NaCl y con las obtenidas por otros autores Zheng Chen y col. [20] quienes asocian las señales obtenidas a estos potenciales a fases oxigenadas de titanio, donde el oxígeno se encuentra disuelto en el metal.

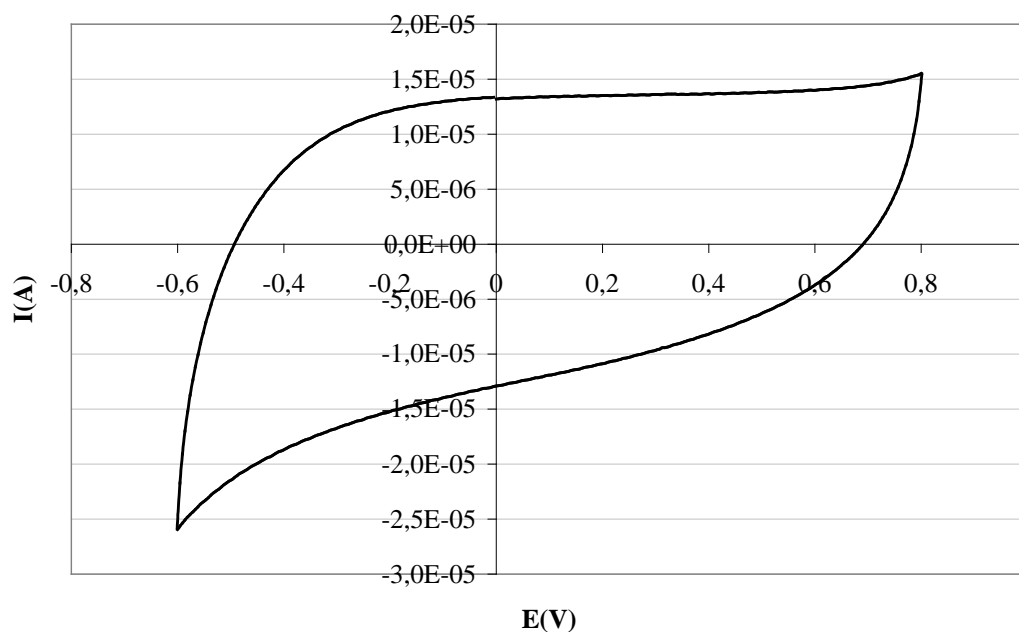


Fig. 4.14 VC con Ti_4O_7 como electrodo de trabajo en una disolución de PBS 0,01M usando como contraelectrodo Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl. El voltamograma es registrado desde -0,6 a 0,8V y la velocidad de barrido es de 20mV/s.

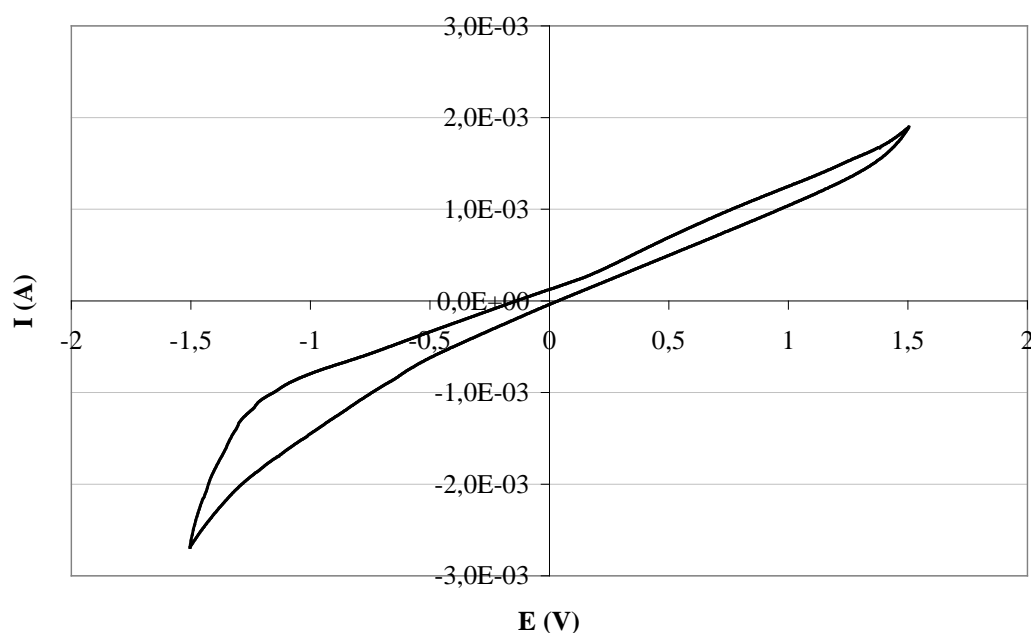


Fig. 4.15 VC con Ti_4O_7 como electrodo de trabajo en una disolución de PBS 0,01M usando como contraelectrodo Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl. El voltamograma es registrado desde -1,5 a 1,5V y la velocidad de barrido es de 20mV/s.

Los mismos ensayos de VC se realizan en medio Neurobasal (NB). En la **Fig 4.16** se muestra el voltamograma registrado entre -0.6 y 0.8 V. Sobre él se mide la capacidad de almacenamiento de carga de la misma manera que se hizo en medio PBS y se obtiene un valor de 106.7 mC/cm^2 . El siguiente voltamograma, representado en la **Fig. 4.17** y registrado entre -1 y 2 V indica la amplitud de la ventana de valores de potencial a los que el electrodo, puede trabajar sin riesgo de que se produzcan reacciones que puedan cambiar las condiciones del electrodo o del medio. Según los resultados obtenidos se puede trabajar con total seguridad desde -0.5 a 1.5 V.

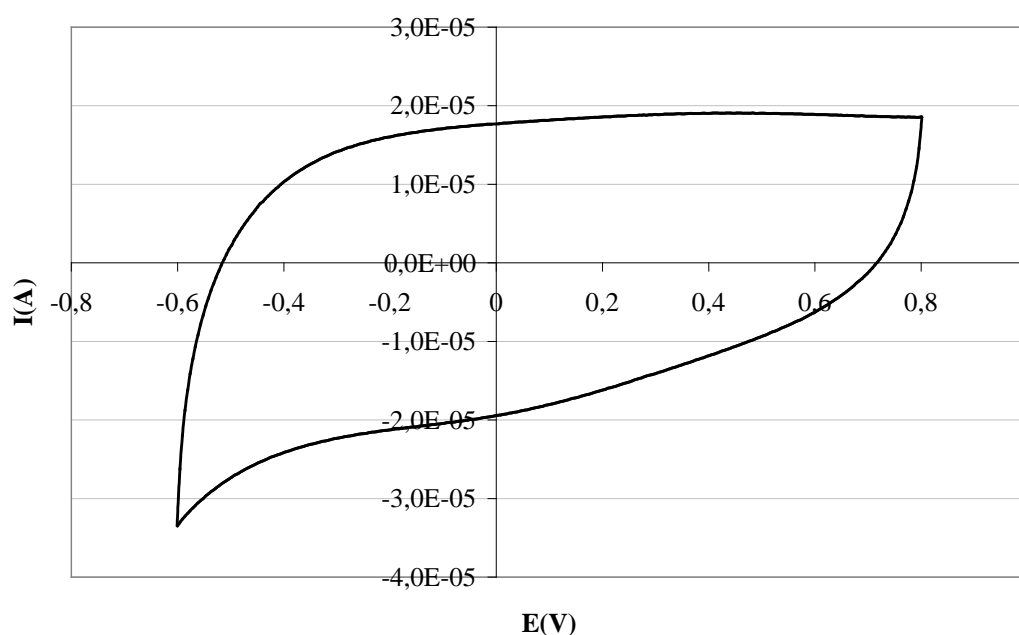


Fig. 4.16 VC con Ti_4O_7 como electrodo de trabajo en medio NB usando como contraelectrodo Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl. El voltamograma es registrado desde -0,6 a 0,8V y la velocidad de barrido es de 20mV/s.

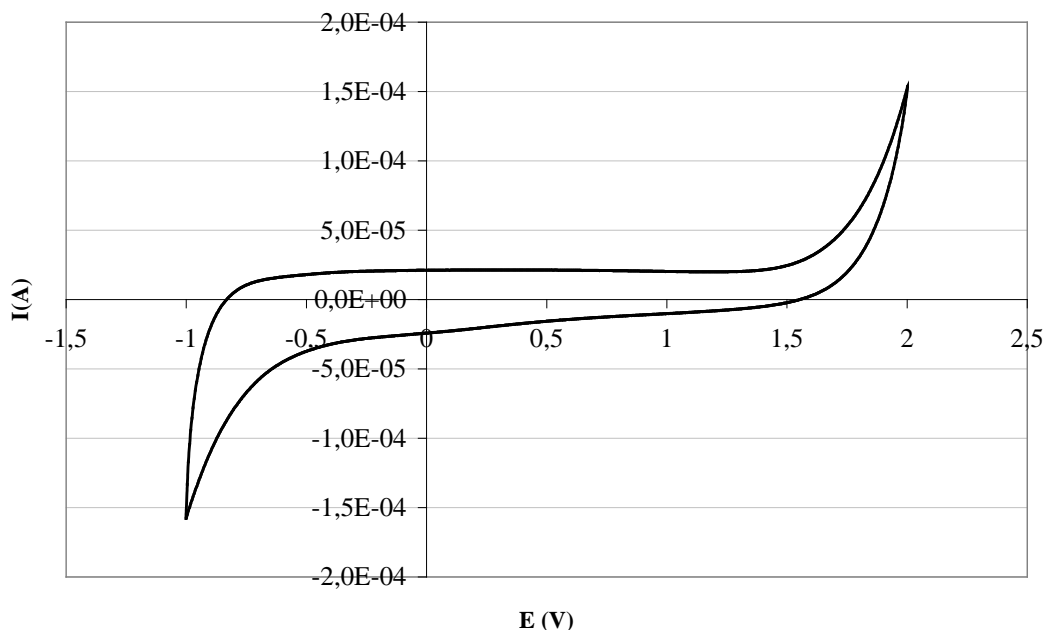


Fig. 4.17 VC con Ti_4O_7 como electrodo de trabajo en medio NB, usando como contraelectrodo Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl . El voltamograma es registrado desde -1,5 a 1,5V y la velocidad de barrido es de 20mV/s.

Por último, se estudia las propiedades del material usado como electrodo en relación con el medio fisiológico mediante impedancia compleja siguiendo el protocolo mostrado en la bibliografía [1]. Los ensayos se realizan usando una amplitud de onda pequeña (50mV) en un rango de frecuencias $10\text{-}10^6$ Hz. Además las medidas se realizan en dos puntas, usando como electrodo de trabajo el disco de Ti_4O_7 (y el Pt como blanco de medida o control), y en todas las medidas, el Pt como contraelectrodo. Dicho ensayo se lleva a cabo en medio PBS 0,01 M y NB.

En la **Fig 4.18** se muestra el diagrama de Nyquists para el espectro de impedancia del Ti_4O_7 en medios PBS y NB. En ambos casos, el espectro se asocia con el circuito representado en la **Fig 4.19**, y que se compone de una resistencia (R_s) en serie con un capacitor (CPE) que actúa en paralelo con una segunda resistencia R_1 . R_s se asocia a la resistencia de medio donde el electrodo está sumergido, mientras que R_1 está determinada por el diámetro del semicírculo en el eje real ($Z_{im}=0$), y representa la resistencia de polarización o la resistencia de transferencia de carga (CTR). Este CTR normalmente varía con adsorción de sustancias en la superficie del electrodo [21], y en este caso en concreto, puede representar el límite de transferencia de carga a través de la interfase y de la doble capa capacitiva. La frecuencia de dispersión se ejemplifica como un CPE, en vez de como un capacitor puro debido a la uniformidad y rugosidad del material. Otro parámetro importante que concierne a la impedancia del electrodo es la constante de tiempo representada por la **Ec. 4.1**:

$$Z_{CPE} = [Q(j\omega)^n]^{-1} \quad \text{Ec. 4.1}$$

Donde, Q representa una combinación de las propiedades de la superficie y especies electroactivas del electrodo. Y n posee valores entre $-1 \leq n \leq 1$. $n=1$ indica comportamiento capacitivo, mientras que $n=0.5$ indica un proceso de transferencia de masa y carga (difusión).

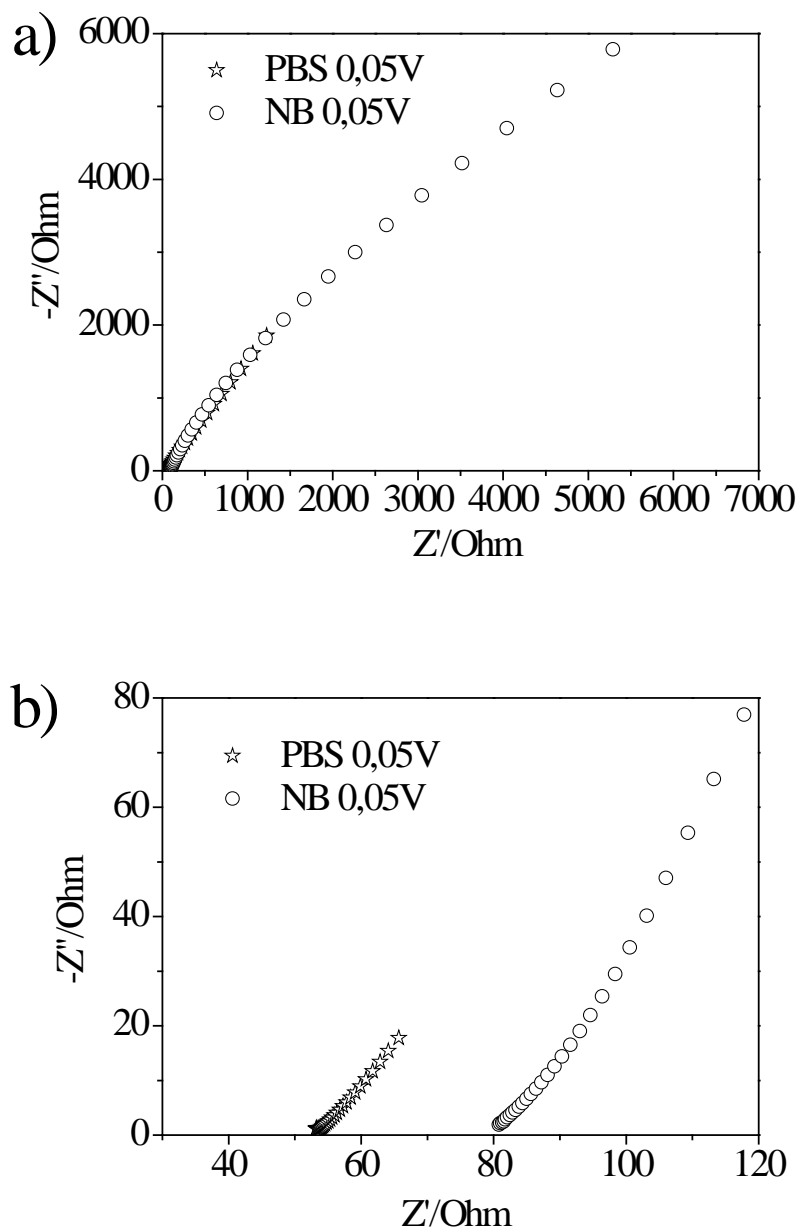


Fig 4.18 EIC en dos puntas, donde el Ti_4O_7 actúa como electrodo de trabajo, y el Pt como contraelectrodo, en medio PBS 0.01M y NB a) Diagrama de Nyquist y b) detalle del corte en el eje Z' .

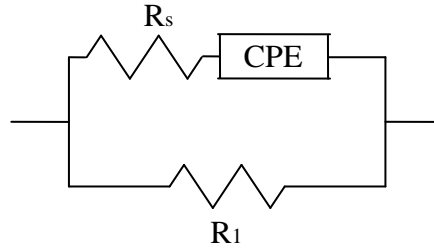


Fig 4.19 Circuito equivalente al comportamiento del electrodo Ti_4O_7 en medios PBS y NB representado en el diagrama de Nyquist de la **Fig. 6.18**.

La **Tabla 4.4** muestra los parámetros determinados tras el ajuste de los datos experimentales en el circuito equivalente considerado. Es claro que R_s varía según electrodo usado y que los valores determinados en las medidas llevadas a cabo con el electrodo de Pt son más bajas que para las medidas realizadas con electrodo Ti_4O_7 . Hay que aclarar que el área de cada electrodo no es la misma por lo que probablemente está influenciando en el dato. En cualquier caso, el medio PBS es claramente más conductor que el medio NB.

Tabla 4.4 Resumen de los valores calculados para los parámetros determinados (R_s , R_1 , CPE y n) tras el ajuste de los datos experimentales en el circuito equivalente considerado.

Sample	R_s (Ohm)	R_1 (Ohm)	CPE (F)	n
Pt PBS	22	1.79×10^4	5.60×10^{-4}	0.81
Pt NB	32	1.88×10^3	5.18×10^{-4}	0.74
Ti_5O_9 PBS	54	2.29×10^4	3.67×10^{-4}	0.69
Ti_5O_9 NB	81	3.89×10^4	6.11×10^{-5}	0.70

A continuación se muestra el comportamiento del electrodo de Pt en los medios PBS y NB, trabajando en las mismas condiciones, también mediante diagrama de Nyquist (**Fig 4.20**).

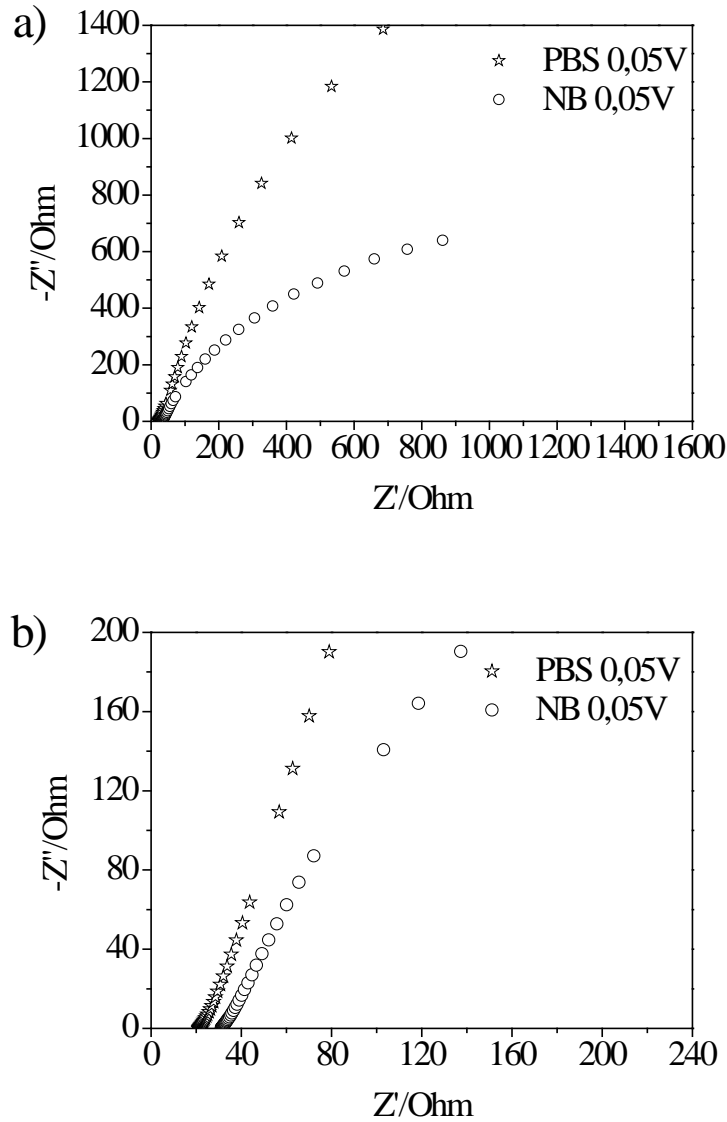


Fig 4.20 EIC en dos puntas, donde el Pt actúa como electrodo de trabajo, y el Pt como contraelectrodo, en medio PBS 0.01M y NB a) Diagrama de Nyquist y b) detalle del corte en el eje Z' .

Finalmente, cuanto más próximo a 1 es el valor de n , mas capacitivo en la interfase electrodo-electrolito. A la contra, cuanto más próximo a 0.5 es este valor, indica un comportamiento por difusión, lo que implica un proceso de transferencia de carga. Para el electrodo de Pt, los valores de n van desde 0.81 en PBS hasta 0.74 en NB. En cualquier caso son superiores a los encontrados para el Ti_4O_7 lo que indica un mecanismo de inyección de carga pseudo-capacitivo. Para el electrodo de Ti_5O_9 los valores en ambos medios son prácticamente iguales 0.7, lo cual, es indicativos de una mayor resistencia asociado a la porosidad de la superficie del electrodo.

4.2.4 Cultivos celulares

La capacidad de neutralización de ROS/RNS por parte de las superficies de Ti_5O_9 será estudiada y demostrada en el Capítulo V. Dicha capacidad está directamente relacionada con la biocompatibilidad de los materiales estudiados. La capacidad de inhibición de una respuesta inflamatoria crónica en condiciones biológicas, susceptible de terminar en un encapsulamiento del material, es de gran importancia en la aplicación específica de este tipo de materiales. Como ya ha sido explicado, este tipo de encapsulamiento reduce la funcionalidad del electrodo al aislarlo del medio.

En la progresión del trabajo resultó interesante estudiar el comportamiento de las células neuronales sobre dichos materiales, para así evaluar *in vitro* su posible toxicidad y su capacidad de interacción con estas células. En este trabajo de tesis se ha observado la relación entre la morfología superficial de las muestras anteriormente estudiada, con la adherencia, supervivencia y crecimiento de las células. Por ello, se realizaron cultivos celulares neuronales siguiendo el protocolo descrito en el capítulo II, con células provenientes de la corteza cerebral de un embrión de rata E14-E18 a 4 y 10 DIV. Para la observación de los cultivos se llevó a cabo un estudio inmunocitoquímico.

En la evaluación estadística realizada de los cultivos se concluyó que, los mismos estaban compuestos casi exclusivamente por neuronas, representado el resto de células menos del 0,1% de la población, lo que indica una gran selectividad de las células capaces de adherirse a la superficie del material y crecer. Esto significa una buena biocompatibilidad con el material. En la **Fig. 4.21** se observa cómo las neuronas no muestran tendencia a la formación de *clusters*, lo cual, indica una mayor adhesión de las células al sustrato. Sin embargo, el análisis estadístico de los resultados (**Fig. 4.22**) indica que la población de células que sobreviven después de 4 y 10 días *in Vitro* (DIV) es del 50% (la densidad de células sembradas fue de 25000 células/cm²), lo que supone una supervivencia celular significativamente inferior comparado con el control (ANOVA $p < 0.001$), **Fig. 4.22**. Este hecho probablemente sea debido a que la gran rugosidad, debida a una elevada porosidad, que presenta la superficie, tal y como muestran las micrografías de MEB y AFM, dificulte la

adherencia de las células a ella (RMS= 0.459). No obstante, el que no exista diferencia entre los cultivos a 4 y 10 DIV (t test $p=0,855$) demuestra que las células adheridas en un primer momento sobreviven con el tiempo y esto se traduce como una baja citotoxicidad del material. Es decir, el material es biocompatible y las células a él adheridas sobreviven y crecen, el problema es que su elevada rugosidad, debida a la gran porosidad de la superficie, dificultan un primer contacto célula-material y, por tanto, la adhesión de un alto porcentaje de ellas. De cara a la aplicación a la que está dirigida el material, como electrodo para estimulación, uno de los requisitos indispensables es la biocompatibilidad, evitando que un posible proceso inflamatorio aisle la superficie del electrodo del tejido o el medio fisiológico. El hecho de que la adhesión de las células a la superficie del electrodo sea baja no es determinante, ya que el interés no es que el tejido quede adherido al electrodo sino que éste inyecte carga al tejido, puesto que su función es la electroestimulación para el crecimiento de las células no servir de soporte-guía para las mismas. Sí que se observa una disminución en el número de neuritas emitidas tras 4 y 10DIV en contraste con el control, no obstante en las fotografías de la **Fig 4.21** se observa una mayor longitud en todas las células y que se ha atribuido al axón de cada una de las neuronas.

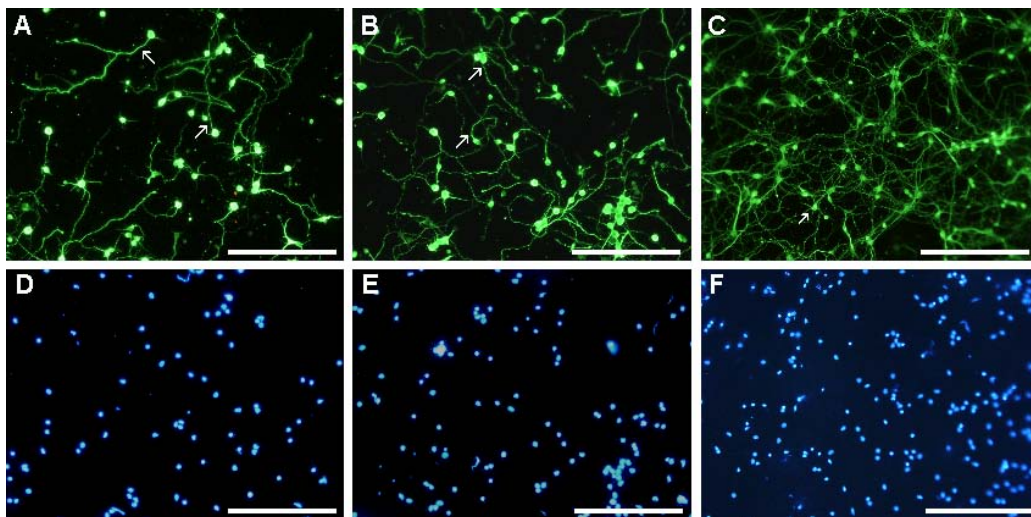


Fig. 4.21 Crecimiento celular neuronal sobre muestras densas reducidas a Ti_5O_9 a los cuatro (A y D) y diez (B y E) DIV y sobre substratos control (C y F) a los cuatro DIV. Las neuronas se visualizan mediante microscopía de fluorescencia de Tau inmunocitoquímica en A, B y C. En D, E y F el núcleo celular se visualiza mediante tinción de Hoechst para evaluar la viabilidad de las células. Escala 200 μm .

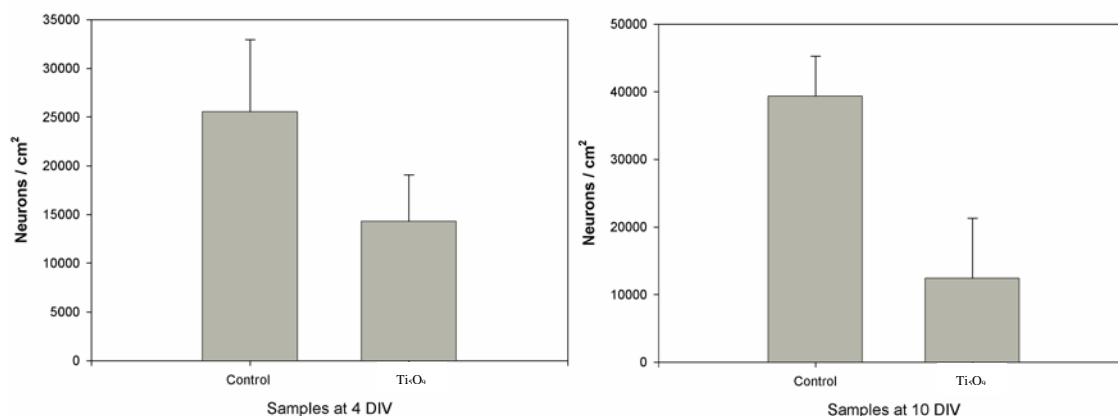


Fig. 4.22 Supervivencia en cultivos celulares neuronales a) a los 4 DIV b) a los 10 DIV sobre discos densos reducidos a Ti_5O_9 . *** = $p < 0.001$

4.3 Síntesis y caracterización de TiN

Las muestras en polvo y los discos de TiN se obtienen a partir de la nitruración de los materiales de TiO_2 mediante tratamiento térmico entre 600°C - 1200°C durante 3h en atmósfera de NH_3 , como se explica en el Capítulo II.

Distintas muestras en polvo y discos densos de TiO_2 han sido sometidas a tratamientos de nitruración a diferentes temperaturas obteniendo materiales que presentaban distintos colores según la temperatura de tratamiento. La siguiente tabla, **Tabla 4.5**, muestra los colores que presentaron los materiales tras el tratamiento a distintas temperaturas. La gama de colores de las muestras va desde el gris claro hasta el dorado, coloración que está directamente relacionada con distintos grados de nitruración como se verá en el apartado de caracterización (4.3.1), todos ellos presentaban un cierto brillo metalizado.

Tabla 4.5. Resumen de la coloración que poseen los materiales obtenidos por nitruración de TiO_2 a diferentes temperaturas.

Temperatura de nitruración	Color
600°C	Gris marengo
700°C	Gris marengo
800°C	Dorado oscuro
1000°C	Dorado oscuro
1100°C	Dorado
1200°C	Dorado

Otra observación a nivel macroscópico reveló la presencia de grietas en las muestras densas nitruradas a 1200°C (**Fig. 4.23**). Dichas grietas le aportan a la muestra fragilidad mecánica y una discontinuidad que disminuye la conductividad, y por todo ello, se la descarta para su uso como electrodo.

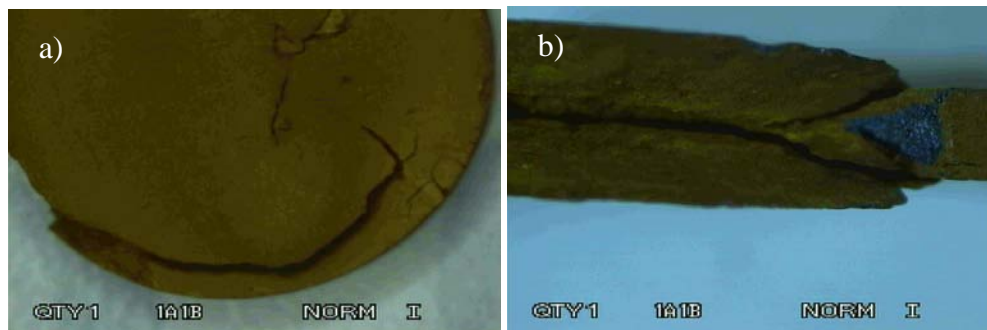


Fig. 4.23. Imágenes de lupa óptica de una muestra de TiO_2 nitrurada a 1200°C/3h a) superficie del disco b) perfil del mismo.

No obstante, es importante señalar que la zona de fractura se pueden observar dos coloraciones distintas en el interior (dorada) y la superficie del disco (gris oscuro), lo que supone dos composiciones diferentes. La nitruración, igual que ocurría con la reducción, va de la superficie hacia el interior. En la imagen **6.23 b** se pueden distinguir, a nivel macroscópico, el cambio de color en el material, según va disminuyendo el grado de nitruración hacia el interior de la pastilla.

4.3.1 Caracterización de TiO₂ nitrurados

4.3.1.1 Caracterización química

La composición de los materiales nitrurados a diferentes temperaturas (desde los 600°C a los 1100°C), se caracterizaron en primer lugar mediante DRX para conocer, además de la composición, las fases y estructuras en que cristalizan dichos compuestos. Según los resultados de la **Fig. 4.24** sólo se empieza a encontrar evidencia de la existencia de TiN a partir del tratamiento térmico a 800°C. Hallando que la muestra a esta temperatura está formada principalmente por TiO₂ y unos picos de menor intensidad asociados a TiN. Al aumentar la temperatura de tratamiento, se observa cómo, el porcentaje de TiN en fase osbornita (NaCl) aumenta en detrimento del porcentaje de TiO₂ en fase rutilo. Esta segunda fase sigue apareciendo en todos los tratamientos térmicos llevados a cabo hasta 1100°C, por otro lado no ha sido posible detectar ninguna fase de tipo oxinitruro mediante esta técnica.

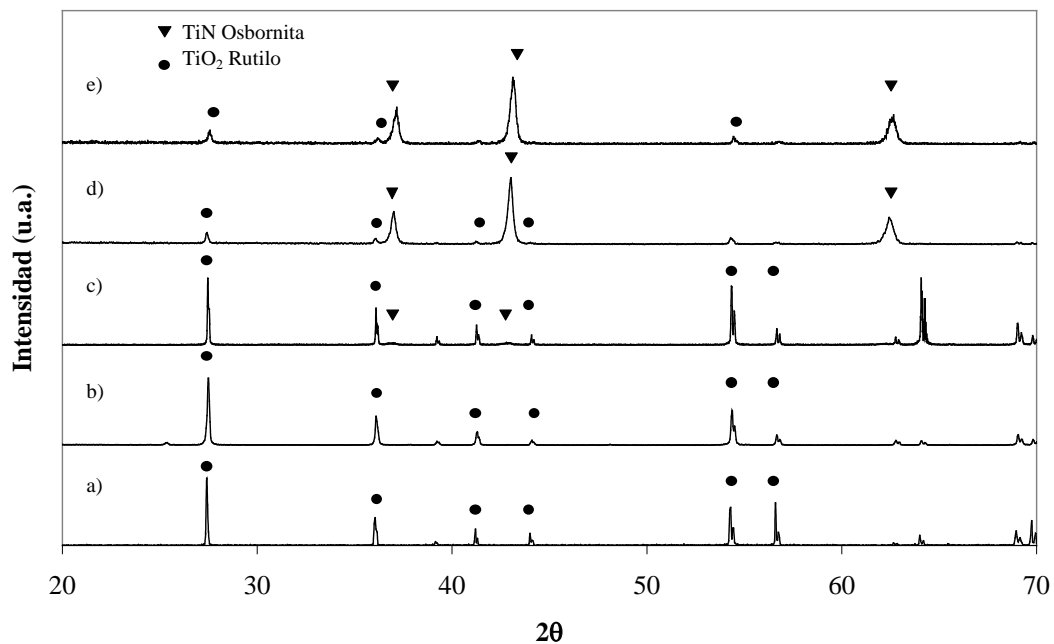


Fig. 4.24 DRX de materiales a) TiO₂ y nitrurados a b) 700°C, c) 800°C, d) 900°C y e) 1100°C.

De todas las muestras preparadas, se seleccionó la muestra obtenida a 1100°C por ser la que presentaba un menor contenido en TiO₂ en su difractograma de rayos X. En esta muestra se llevó a cabo el estudio de su composición superficial por XPS,

comparando los resultados con la muestra nitrurada a 700°C y que únicamente presentaba en su DRX fase cristalina rutilo.

Tabla 4.6. Energías de ligadura de los electrones situados en orbitales próximos al núcleo (eV) de las muestras nitruradas a 700 y 1100 °C. Los valores entre paréntesis indican las intensidades relativas de las bandas del espectro.

Tratamientos	Ti 2p _{3/2}	O 1s	N 1s	N/Ti atomos
TiO₂+NH₃ 700°C/3h	455.6 (79)	529.8 (57)	396.0 (60)	1.80
	458.1 (21)	531.6 (43)	399.5 (40)	
TiO₂+NH₃ 1100°C/3h	455.7 (60)	529.9 (61)	396.0 (26)	2.39
			397.2 (62)	
	458.0 (40)	531.4 (39)	399.5 (12)	

La **Tabla 4.6** muestra un resumen de los resultados obtenidos de dichos espectros, el TiO₂ ha sido sometido a una nitruración parcial como indica el componente la banda Ti2p_{3/2}, encontrado a partir de la deconvolución del espectro, situada a 455.6 eV para la muestra nitrurada a 700°C y a 455.7 eV para la nitrurada a 1100°C. El espectro correspondiente al N1s, puede ser deconvolucionado en tres componentes diferentes que son asociadas a la presencia de tres especies distintas TiN (396.0 eV), TiN_xO_y (397.2 eV) y amoniaco adsorbido en la superficie como residuo del tratamiento de síntesis (399.5 eV). La presencia de oxinitruro se detecta en las muestras nitruradas a 1100°C pero no en la de 700°C, lo que parece que da a entender que la nitruración de las primeras capas da como resultado directamente TiN puesto que el desalojo del oxígeno no encuentra ningún impedimento, y que con 700°C es suficiente. Pero a medida que el proceso de nitruración va hacia el interior de la pastilla, favorecido por una mayor temperatura, el oxígeno que abandona la red tiene que recorrer un camino mayor a través de la red cristalina para abandonar el material. A pesar de que la temperatura parece apropiada el tiempo posiblemente sea menor del necesario para que se complete el intercambio de O por Ni, y por ello parte del oxígeno quede aún atrapado formando los oxinitruros (Ti2p_{3/2} 458.0 eV y O1s a 531.4 eV).

4.3.1.2 Caracterización eléctrica

La conductividad eléctrica de las muestras nitruradas a diferentes temperaturas, se midió al igual que en el caso de los materiales de la serie de Magneli, mediante el método de 4 puntas en DC. La **Fig. 4.25** muestra las variaciones de conductividad de las muestras preparadas en función de las temperaturas de nitruración. Los materiales se midieron a 40°C (temperatura próxima a la corporal), se observa un aumento exponencial de la conductividad con la temperatura. Estas variaciones tan bruscas en los valores de conductividad pueden ser explicadas en relación a la composición de fases encontrada en los análisis de DRX. El hecho de que la fase TiN sólo sea mayoritaria en la muestra nitrurada a 1100°C, explica el elevado valor de conductividad de la misma, en relación a las demás, donde el porcentaje de TiO₂, que es una fase aislante, es mayor y por lo tanto contribuye a disminuir la conductividad. Finalmente, la conductividad de la muestra a 1200°C no pudo ser medida debido a la fragilidad que presentaba.

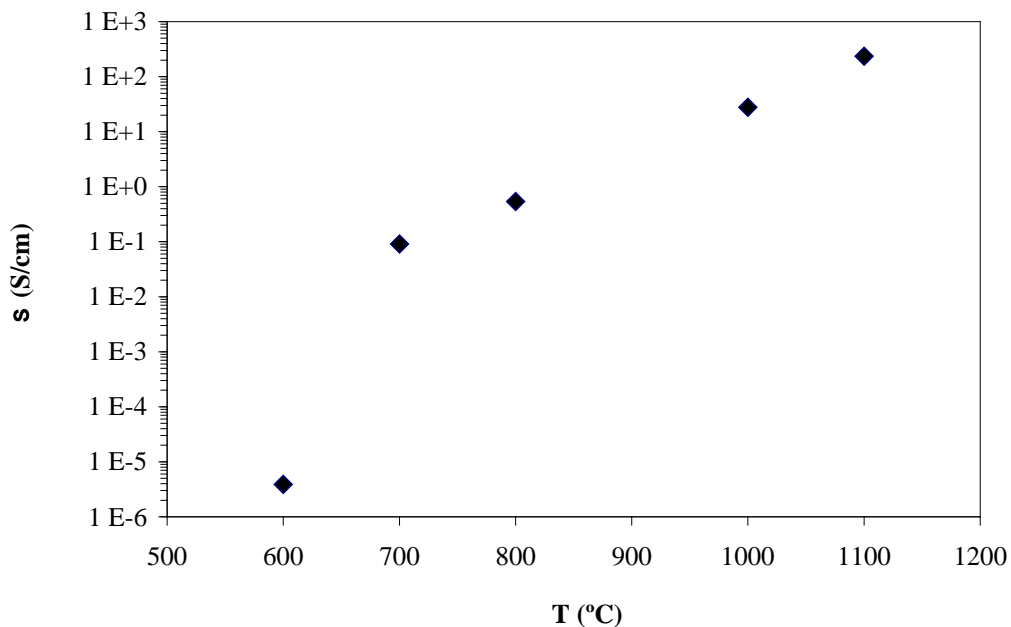


Fig. 4.25 Representación de los valores de conductividad eléctrica medidos en cuatro puntas DC, en aire a 40°C, en función de la temperatura de nitruración.

4.3.2 Caracterización de TiN obtenido por nitruración de TiO₂ en NH₃ a 1100°C/3h

El TiN obtenido a partir de la nitruración mediante tratamiento térmico del TiO₂ a 1100°C durante 3h en atmósfera de NH₃ ha sido seleccionado como el mejor de estos materiales para su uso como electrodo por las siguientes razones: Su difractograma de rayos X revela que cristaliza en el compuesto TiN en fase Osbornita (NaCl). El espectro de XPS también muestra una banda asociada a dicho compuesto y además otras asociadas a la presencia en superficie de oxinitruros. Por otro lado, la conductividad eléctrica es la más elevada de todas las muestras. Además, las propiedades mecánicas que presentan son adecuadas para permitir su manejo como electrodo. Por todo ello, de esta muestra se hace un estudio más detallado centrado en la determinación de sus propiedades para su uso como electrodo.

De la muestra densa de TiN se realizó el análisis térmico que se ve en la **Fig. 4.26**. Dicho análisis se compone, por un lado, de una curva de ATD que muestra un pico y un hombro exotérmico a 598°C y 712°C que están asociado a un aumento de masa como desvela la curva de TG que comienza a una temperatura ligeramente inferior de 500°C [22]. Esto se traduce en la formación de TiO₂ sub-estequiométrico, el cual cristaliza a 712°C. Dicha cristalización queda reflejada en forma de hombro en la curva de ATD. La oxidación total que finaliza con la formación de TiO₂ estequiométrico se observa a 952°C con un nuevo pico exotérmico en la curva de ATD que va acompañado de un último aumento de masa en la curva TG.

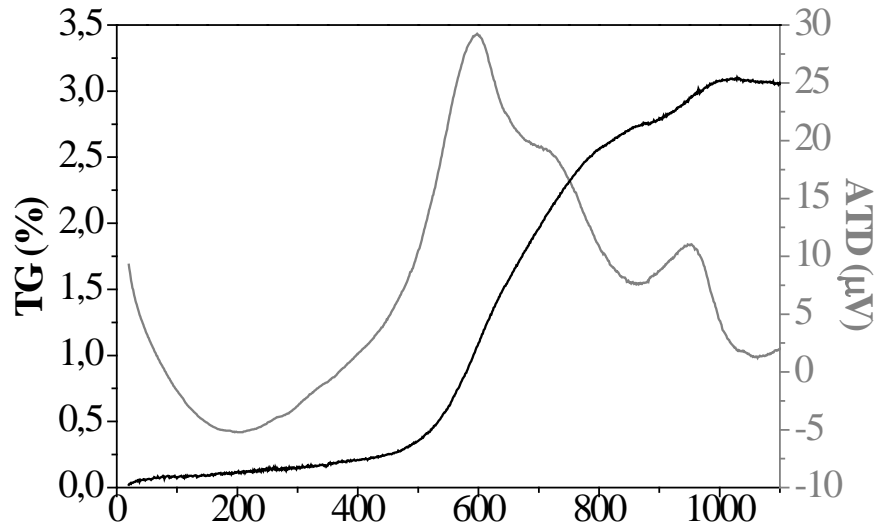


Fig. 4.26 Curvas de ATD-TG del material de TiN denso, obtenido por nitruración de TiO_2 denso, realizado en aire.

También se llevó a cabo el estudio microestructural de la muestra sin pulir. En primer lugar, se hizo una observación en una lupa óptica, de la que se concluye que la superficie se caracteriza por tener una elevada rugosidad y que está salpicada por numerosas grietas **Fig. 4.27**.

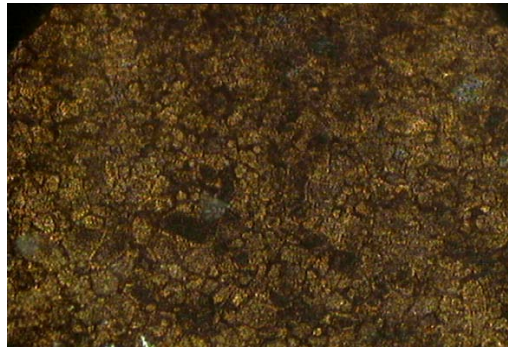


Fig. 4.27 Micrografía obtenida en lupa óptica (20X) de una muestra densa de TiN obtenida por nitruración de un disco denso de TiO_2 nitrurado en atmósfera de NH_3 a $1100^\circ\text{C}/3\text{h}$.

Una observación más detallada de la superficie se hizo mediante MEB. En una primera inspección más general, se encuentra una superficie donde se pueden observar los granos que la componen y zonas colonizadas por grietas generadas en la síntesis del material, con otras zonas menos accidentadas. Sobre dicha superficie además se detectan aglomerados de partículas esféricas. (**Fig. 4.28**)

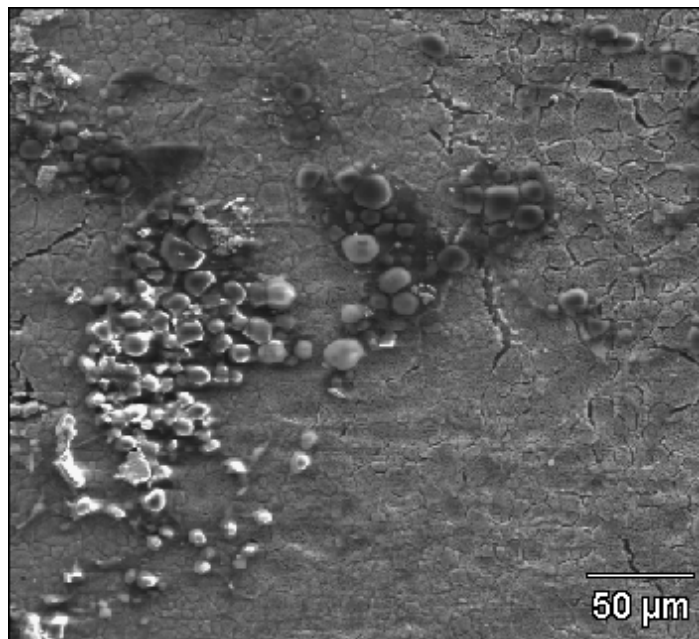


Fig. 4.28 Micrografía de MEB de una muestra de TiN obtenida por nitruración en atmósfera de NH_3 a $1100^\circ\text{C}/3\text{h}$.

Un examen más detallado y a mayores aumentos de las diferentes zonas que componen la superficie del material reveló, tras un análisis EDX, que estas partículas globulares estaban compuestas por TiO_2 , y que el rango de tamaños de las mismas estaba comprendido entre 5 y 10 μm (**Fig. 4.29 a**). La **Fig. 4.29 b** muestra la superficie del material, donde se observa que las grietas aparecen en los bordes de grano. Dichos granos muestran dimensiones homogéneas en el orden de 5 a 10 μm . Las superficies de los granos presentan elevada rugosidad, están salpicadas de numerosos poros de tamaños inferiores a 1 μm , debido al tratamiento de nitruración. El análisis de EDX de dicha zona y el mapeo de este elemento sobre la muestra (**Fig 4.29 a N K y b N K**) desvelan la presencia de nitrógeno en esta zona de la muestra, lo que indicaría una composición mayoritaria de TiN.

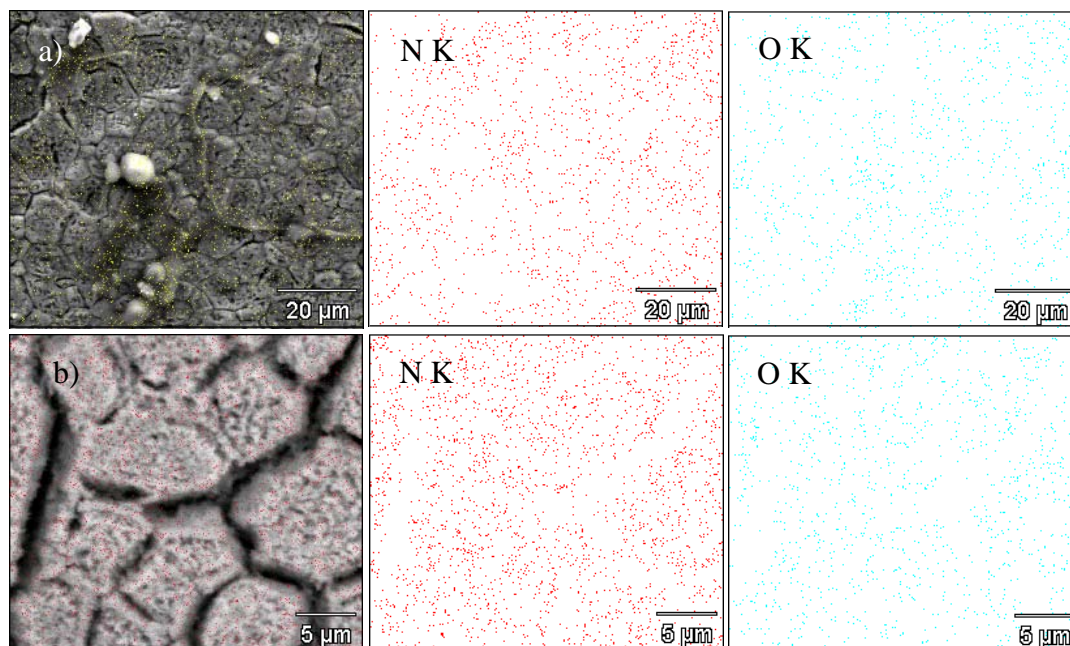


Fig. 4.29 Micrografías de MEB y mapeo de N de una muestra densa de TiN obtenida por nitruración a partir de un disco denso de TiO_2 por nitruración en atmósfera de NH_3 a $1100^\circ\text{C}/3\text{h}$. a) Partículas esféricas sobre la superficie, junto con un mapeo de nitrógeno (N K) y de oxígeno (O K) y b) superficie del disco, junto con un mapeo de nitrógeno (N K) y de oxígeno (O K).

Los datos del análisis de EDX y mapeo (**Fig. 4.29 b** N K y O K) confirman los resultados obtenidos por XPS, mostrados en la **Tabla 4.6**, que en la superficie del material están presentes tanto N como O, por lo que se puede concluir que una parte significativa de la superficie del disco nitrurado está compuesto por oxinitruro de titanio (TiN_xO_y).

Además, la superficie de esta muestra se caracteriza mediante ángulo de contacto, para estudiar la interacción entre ésta y un medio acuoso. La **Fig. 4.30** muestra la imagen tomada durante el ensayo realizado y sobre la cual se realizaron la medida y cálculos correspondientes. El ángulo resultante de la medida es de 99° , lo que significa que se trata de una superficie hidrófoba.

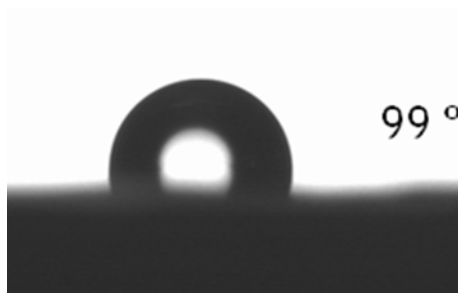


Fig. 4.30 Medida del ángulo de contacto sobre una superficie del TiN preparado en atmósfera de NH_3 a $1100^\circ\text{C}/3\text{h}$.

Un comportamiento hidrófobo de la superficie implica una baja mojabilidad del mismo en presencia de un medio de cultivo (de naturaleza acuosa), lo que supone un obstáculo para la adherencia de células durante el cultivo de las mismas en la superficie del sustrato.

Se estudió el comportamiento celular sobre el sustrato llevando a cabo cultivos celulares con células que provienen de la corteza cerebral de embriones de rata E18 Wistar 4DIV (**Fig. 4.31**). Para la observación y estudio de los cultivos se combinaron ensayos inmunocitoquímicos con tinción de las células por el método Hoechst. Dichos cultivos celulares están casi exclusivamente compuestos de células neuronales. El resto de tipos celulares en su conjunto representa tan solo un 0,1% de la población de dicho cultivo. Las células cultivadas no tienden a la formación de *clusters* que dificulten la cuantificación de las células adheridas y que permanecen vivas. La supervivencia celular sobre el sustrato de TiN es mucho menor en comparación con el control. Por otro lado, las células no se ramifican adecuadamente dificultando la formación de contactos entre células y la formación de una red de conexiones entre ellas. No obstante, las células se caracterizan por poseer axones largos y bien definidos. Como ocurría con los materiales pertenecientes a las fases de Mágneli, y puesto que el desarrollo de este material también se orienta a su uso como electrodo, el interés no es que las células se adhieran y crezcan en la superficie, sino que no sea citotóxico o incompatible para las células de este tipo de tejido.

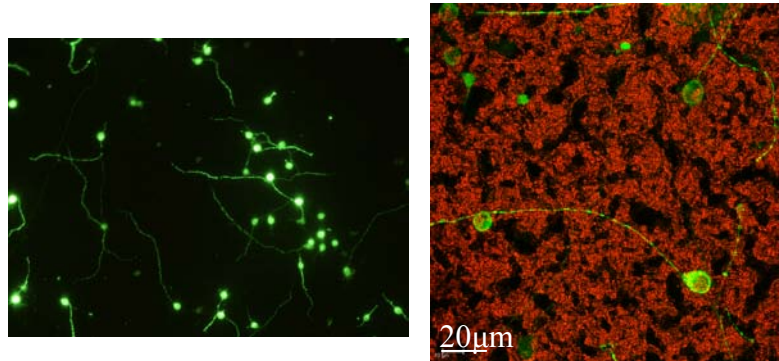


Fig. 4.31 Micrografías de cultivos celulares de células neuronales obtenidas de la corteza cerebral de embriones de rata Wistar E18 sobre una superficie de TiN nitrurada a 1100°C. Para la identificación de células vivas se llevó a cabo la observación mediante marcaje indirecto con doble-inmunofluorescencia combinado con tinción del núcleo por el método Hoechst.

La medida de la conductividad de dicha muestra en función de la temperatura indica un comportamiento parecido al de las fases de la serie de Magnéli en el sentido en que revela un cambio en el mecanismo de conducción semiconductor-metálico, con un máximo de conductividad $\sigma \approx 2917$ S/cm) a 60°C. A 37°C la temperatura es aproximadamente 200 S/cm (**Fig. 4.32**).

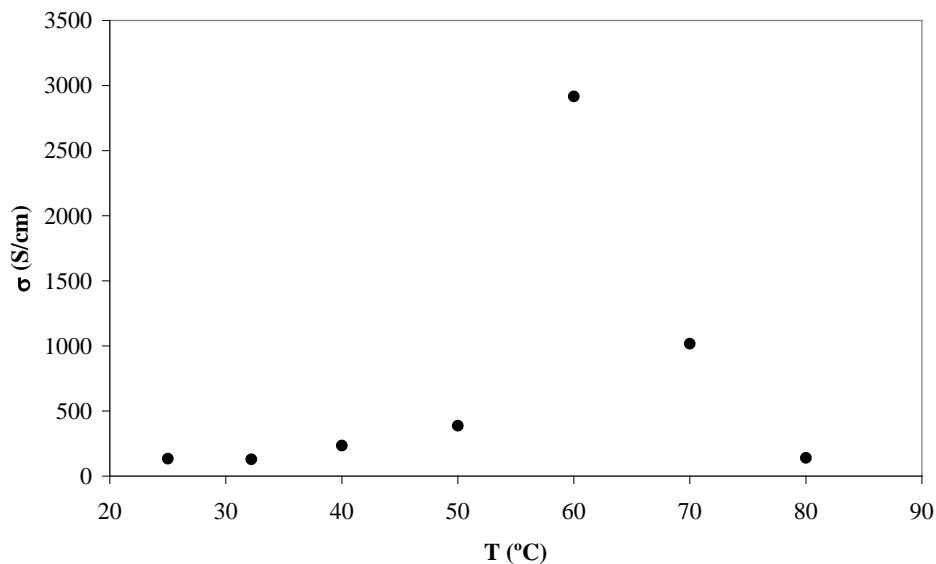


Fig. 4.32 Conductividad eléctrica, medida en 4 puntas en DC en aire, en función de la temperatura de una muestra de TiN obtenida a partir de la nitruración de un disco denso de TiO₂ en NH₃ a 1100°C/3h.

Al igual que con el Ti_4O_7 , se estudia el mecanismo a través del cual el TiN inyecta carga y la ventana de potenciales, dentro de la cual, dicho material puede trabajar sin que tengan lugar reacciones en la superficie del electrodo o el medio. En primer lugar se estudia en medio PBS. Para ello se realizan 100 barridos a 100 mV/s, para finalmente registrar el voltamograma a 20mV/s (**Fig. 4.33**). El voltamograma tiene una forma similar que en el caso del registrado en las mismas condiciones para el Ti_4O_7 (**Fig. 6.16**), y además, sus intensidades de corriente coinciden. Dicha forma se corresponde a un mecanismo de inyección de carga de tipo capacitivo, lo cual corresponde a lo encontrado en la bibliografía para electrodos de TiN en *coatings* [1, 23]. No obstante, aparecen unas señales de poca intensidad a -100mV y a 100mV que se pueden asociar a una reacción redox de tipo reversible. Algunos autores han señalado la aparición de señales de oxidación en electrodos de TiN, caracterizados por una superficie rugosa, cuando el voltamograma se registra a velocidades inferiores a 100mV/s [24]. Estas condiciones son las que tienen lugar en nuestro caso, un electrodo de trabajo de TiN, caracterizado por una superficie rugosa (con grietas y numerosos poros inferiores a un tamaño de 1 μm en los granos), y un voltamograma registrado con una velocidad de barrido de 20 mV/s. Además los potenciales a que se observan las señales de oxidación mostradas en la bibliografía se acercan a las estudiadas en este trabajo. Esta literatura también señala que la aparición de dichas señales no implica que el mecanismo de inyección ya no sea capacitivo por esta razón. Por último, se calculó la CSC sobre el voltamograma, 15.3 mC/cm^2 , la cual, es inferior a la calculada para el Ti_4O_7 , pero aún así, superior a la encontrada para TiN en *coatings* (250 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$), así como para otros electrodos mostrados en la literatura (Pt, 550 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$, SIROF, 2.8 mC/cm^2).

En el voltamograma realizado en medio NB (velocidad de barrido 20 mV/s) volvemos a observar que el perfil coincide con un comportamiento capacitivo (**Fig. 4.34**). De nuevo, y al igual que en el caso del voltamograma obtenido en PBS, tras 20 barridos previos de limpieza a 20mV/s, se aprecian unas señales de oxidación-reducción de tipo reversible (a -150 y 150 mV). Se calcula también en este caso la CSC, 8.4 Neurobasal mC/cm^2 , un valor inferior al obtenido para Ti_4O_7 pero más elevado que el encontrado en la literatura. Este valor solo puede ser comparado al obtenido que se ha dado en la literatura para electrodo SIROF, 2.8 mC/cm^2 [1].

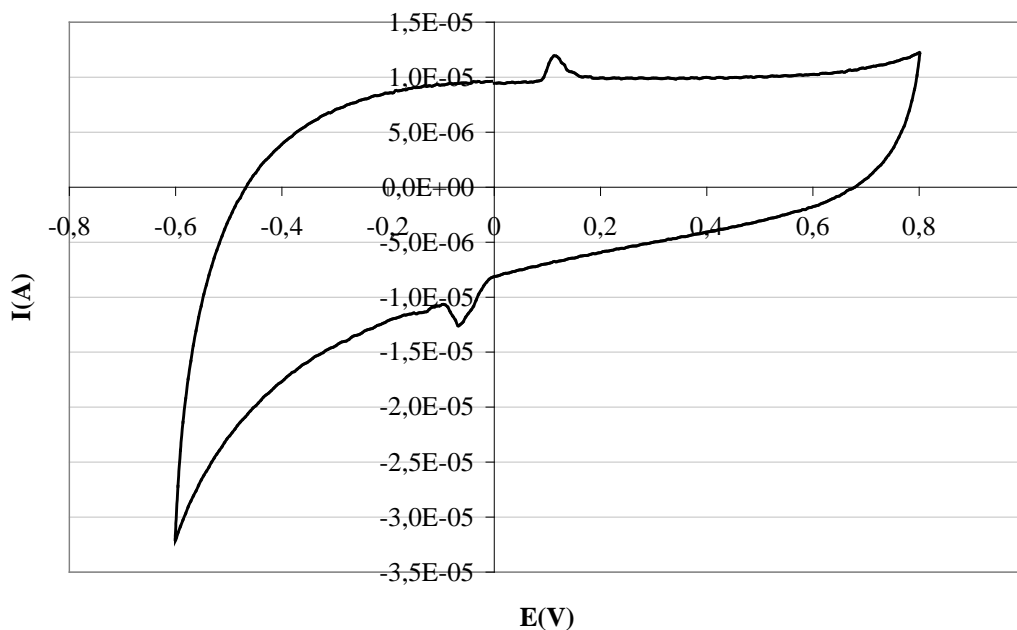


Fig. 4.33 VC con TiN como electrodo de trabajo en una disolución de PBS 0,01M usando como contraelectrodo Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl. El voltamograma es registrado desde -0,6 a 0,8V y la velocidad de barrido es de 20mV/s.

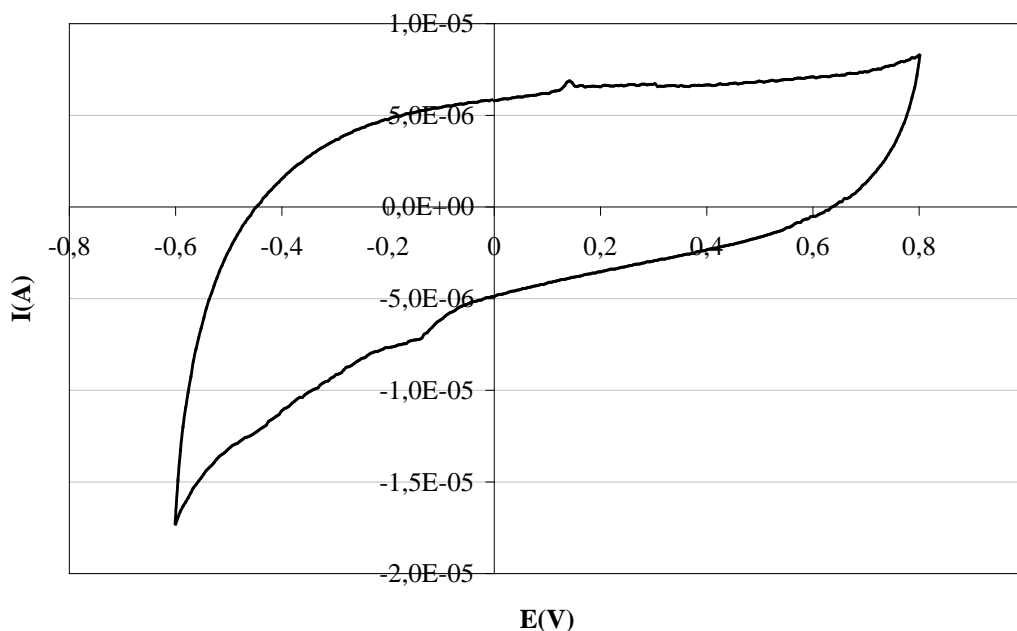


Fig. 4.34 VC con TiN como electrodo de trabajo en medio NB usando como contraelectrodo Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl. El voltamograma es registrado desde -0,6 a 0,8V y la velocidad de barrido es de 20mV/s.

También se realizó un estudio de la capacidad de inyección de carga del material con los medios siguiendo el mismo protocolo que en el caso del Ti_4O_7 , mediante impedancia compleja [1]. En las **Fig. 4.20** ya se han mostrado las impedancias de los dos medios usados (PBS 0,01M y NB) utilizando como electrodo de trabajo y contraelectrodo el Pt; espectros que se emplearán como blancos. A continuación se muestran en las **Fig. 4.35** los gráficos de Nyquist para el TiN como electrodo de trabajo (y Pt como contraelectrodo) en los medios PBS 0,01M y NB, respectivamente. El comportamiento es comparable al de los materiales reducidos.

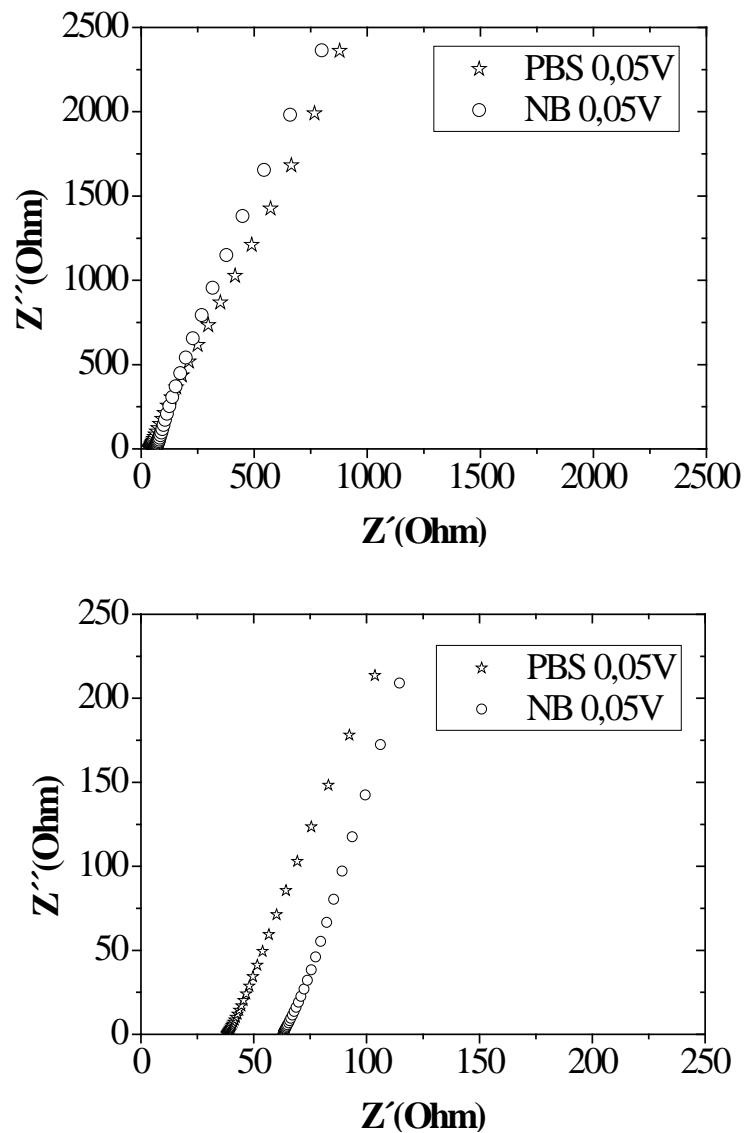


Fig 4.35 EIC en dos puntas, donde el Pt actúa como electrodo de trabajo, y el Pt como contraelectrodo, en medio PBS 0.01M y NB a) Diagrama de Nyquist y b) detalle del corte en el eje Z' .

4.4 Conclusiones

Puesto que se han desarrollado y estudiado dos materiales distintos para su uso como electrodo para electroestimulación en medicina, y a pesar de tener como denominador común su procedencia del TiO_2 , se expondrán sus conclusiones por separado:

Para materiales cerámicos de composición Ti_4O_7 y Ti_5O_9 :

- ❖ Se obtuvieron materiales en cuya composición se encontraban $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$, como mezcla de fases, así como, en fases mayoritarias, mediante tratamiento térmico a 1400°C durante 12h en atmósfera de N_2/H_2 .
- ❖ Las muestras con las que se han llevado a cabo la caracterización mostraron una composición mayoritaria en Ti_5O_9 , una elevada concentración de Ti en estado de oxidación +3 asociado a esta fase.
- ❖ La superficie del material muestra una elevada porosidad tipo cerrado, la cual disminuye desde la superficie al interior de la muestra.
- ❖ Las muestras de composición Ti_5O_9 presentaban un mecanismo de conducción tipo salto electrónico que se caracteriza por un cambio metal-semiconductor a 60°C , donde se alcanza una conductividad máxima de 10833 S/cm . La conductividad eléctrica a 37°C (temperatura corporal), es de superior a 9500 S/cm .
- ❖ La VC con electrodos composición Ti_5O_9 en medio NaCl muestran un compuesto muy estable en condiciones fisiológicas. Sólo a concentraciones saturadas de Na^{2+} , y potenciales a -1V , se observa un hombro que se asocia una reacción de oxidación en los Ti asociados a oxígeno más internos.
- ❖ También se han realizado VC en medios PBS y NB, usando como electrodo de trabajo Ti_5O_9 , para determinar los parámetros de la superficie del electrodo y su superficie. Se encontraron ventanas de potencial de gran amplitud donde el material posee gran estabilidad y no tienen lugar reacciones redox. Además sus valores de CSC van desde 77 a 107 mC/cm^2 , muy superiores a los reportados y posiblemente relacionados con la porosidad en superficie de la muestra. Por último, indica que el mecanismo de inyección de carga

transcurre a través de un mecanismo capacitivo en la doble capa entre el medio y la superficie del electrodo.

- ❖ Las medidas y ajustes por EIC muestran el comportamiento típico de una transferencia de carga, que se compara con una R_{ct} , en paralelo a un CPE, considerado en lugar a un capacitor puro, y que se asocia a la porosidad superficial de la muestra. El valor $n=0.7$ calculado para el CPE, indica un comportamiento entre transferencia de carga y masa que implica un proceso de difusión.
- ❖ Se obtuvieron estructuras 3D como tubos y esponjas de composición Ti_4O_7/Ti_5O_9 . Los tubos poseen una elevada porosidad de tipo cerrado de una $20\ \mu m$. En las esponjas tenemos por un lado, también una microporosidad de tipo cerrado en la que los tamaños rondan las $5\ \mu m$, y otra macroscópica y de tipo interconectado.
- ❖ En los cultivos celulares solo un 50% de las células quedan adheridas en la superficie del material, pero las que se adhieren a esta sobreviven en su mayoría, desarrollando axones largo pero las neuritas no parecen crecer de manera normal. No es importante que las células se adhieran a la superficie del electrodo pero sí que el material sea incompatible y citotóxico para el tejido.

Para el material cerámico de composición TiN:

- ❖ De todos los materiales obtenidos vía nitruración de TiO_2 mediante tratamiento térmico en atmósfera de NH_3 , se selecciono para trabajar el obtenido a $1100^\circ C/3h$ por presentar TiN bien cristalizado en fase Osbornita y la conductividad eléctrica más elevada.
- ❖ Los análisis por XPS revelan la existencia de TiN_xO_y en la muestra nitrurada a $1100^\circ C$.
- ❖ Este material presenta una conductivita máxima de $2917\ S/cm$ a $60^\circ C$. A $37^\circ C$ la conductividad es aproximadamente $200\ S/cm$.
- ❖ La superficie es rugosa compuesta de granos de diámetros entre 5 a $10\ \mu m$, con zonas donde se concentran numerosas grietas así como gran número de poros inferiores a $1\ \mu m$ de diámetro. La composición analizada por EDX confirma la presencia de TiN_xO_y . Sobre la superficie se

encuentran aglomerados de partículas esféricas y aspecto globular. La composición de dichas partículas analizada también por EDX es TiO_2 .

- ❖ Su superficie es de carácter hidrófobo, lo cual puede ser un impedimento en la adhesión de células, lo cual nos puede favorecer si el material se plantea como electrodo, como ocurría con los materiales reducidos.
- ❖ Los cultivos celulares muestran que pocas células se han adherido y desarrollado, no obstante las que lo hicieron no mostraron una ramificación normal pero sí desarrollaron axones muy largos.

Bibliografía

1. Cogan, S.F., *Neural stimulation and recording electrodes*. 2008. p. 275-309.
2. Zhong, Y. and R.V. Bellamkonda, *Biomaterials for the central nervous system*. Journal of the Royal Society Interface, 2008. **5**(26): p. 957-975.
3. Hayfield, P.C.S., *Development of a New Material Monolithic Ti₄O₇ EBONEX[®] Ceramic*. Royal Society of Chemistry, 2002 **Chapter 2**: p. 9-46.
4. Smith, J.R., F.C. Walsh and R.L. Clarke, *Electrodes based on Magnéli phase titanium oxides: The properties and applications of Ebonex[®] materials*. Journal of Applied Electrochemistry, 1998. **28**(10): p. 1021-1033.
5. Walsh, F.C. and R.G.A. Wills, *The continuing development of Magnéli phase titanium sub-oxides and Ebonex[®] electrodes*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(22): p. 6342-6351.
6. Bejan, D., J.D. Malcolm, L. Morrison and N.J. Bunce, *Mechanistic investigation of the conductive ceramic Ebonex[®] as an anode material*. Electrochimica Acta, 2009. **54**(23): p. 5548-5556.
7. Pollock, R.J., *electrochemical properties of a new electrode material, Ti₄O₇*. Mat. Res. Bull., 1984. **Vol. 19**: p. pp. 17-24.
8. Miller-Folk, R.R., R.E. Nofle and D. Pletcher, *Electron transfer reactions at Ebonex ceramic electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1989. **274**(1-2): p. 257-261.
9. Baez, V.B., J.E. Graves and D. Pletcher, *The reduction of oxygen on titanium oxide electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1992. **340**(1-2): p. 273-286.
10. Suzuki, R., J. Muyco, J. McKittrick and J.A. Frangos, *Reactive oxygen species inhibited by titanium oxide coatings*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2003. **66**(2): p. 396-402.
11. Contreras, R., H. Sahlin and J.A. Frangos, *Titanate biomaterials with enhanced antiinflammatory properties*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2007. **80**(2): p. 480-485.
12. Sahlin, H., R. Contreras, D.F. Gaskill, L.M. Bjursten and J.A. Frangos, *Anti-inflammatory properties of micropatterned titanium coatings*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2006. **77**(1): p. 43-49.
13. Kola, P.V., S. Daniels, D.C. Cameron and M.S.J. Hashmi, *Magnetron sputtering of TiN protective coatings for medical applications*. Journal of Materials Processing Technology, 1996. **56**(1-4): p. 422-430.
14. Guyton, D.L. and F.T. Hambrecht, *Theory and design of capacitor electrodes for chronic stimulation*. MED.BIOL.ENGINEERING, 1974. **12**(5): p. 613-620.
15. Rose, T.L., E.M. Kelliher and L.S. Robblee, *Assessment of capacitor electrodes for intracortical neural stimulation*. Journal of Neuroscience Methods, 1985. **12**(3): p. 181-193.
16. Weiland, J.D., D.J. Anderson and M.S. Humayun, *In vitro electrical properties for iridium oxide versus titanium nitride stimulating electrodes*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2002. **49**(12 I): p. 1574-1579.
17. Schaldach, M., M. Hubmann, A. Weigl and R. Hardt, *Sputter-deposited TiN electrode coatings for superior sensing and pacing performance*. PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology, 1990. **13**(12 II): p. 1891-1895.

18. Morozumi, F.A.P.a.T., *Theory of potentiostatic and galvanostatic charging of the double layer in porous electrodes*. Journal of the Electrochemical Society, 1966. **113** N°2: p. 76-84.
19. Cyster, L.A., K.G. Parker, T.L. Parker and D.M. Grant, *The effect of surface chemistry and nanotopography of titanium nitride (TiN) films on primary hippocampal neurones*. Biomaterials, 2004. **25**(1): p. 97-107.
20. Chen, G.Z., D.J. Fray and T.W. Farthing, *Direct electrochemical reduction of titanium dioxide to titanium in molten calcium chloride*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 361-364.
21. Moisel, M., M.A.F.L. De Mele and W.D. Müller, *Biomaterial interface investigated by electrochemical impedance spectroscopy*. Advanced Engineering Materials, 2008. **10**(10): p. B33-B46.
22. Sempere, J., R. Nomen, E. Serra, B. Sempere and D. Guglielmi, *Thermal behavior of oxidation of TiN and TiC nanoparticles*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2011. **105**(2): p. 719-726.
23. Pedrosa, P., E. Alves, N.P. Barradas, P. Fiedler, J. Hauelsen, F. Vaz and C. Fonseca, *TiNx coated polycarbonate for bio-electrode applications*. Corrosion Science, 2012. **56**: p. 49-57.
24. Norlin, A., J. Pan and C. Leygraf, *Investigation of electrochemical behavior of stimulation/sensing materials for pacemaker electrode applications I. Pt, Ti, and TiN coated electrodes*. Journal of the Electrochemical Society, 2005. **152**(2): p. J7-J15.

Capítulo V

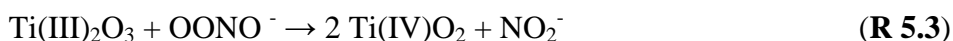
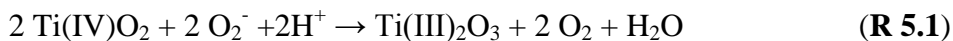
V Estudio de la actividad neutralizadora de especies radicales

5.1 Introducción

Como ya se trató en el Capítulo I de Introducción: “El titanio metálico ha sido usado con gran éxito cómo biomaterial para implantes dentales y prótesis ortopédicas gracias a la gran biocompatibilidad que muestra [1]. Dicha biocompatibilidad se debe a la fina capa superficial de TiO_2 que se forma durante el proceso de pasivación, y que es capaz de neutralizar especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (RNS y ROS)[2]. Cuando un cuerpo extraño es detectado por el organismo, hasta él acuden las células inflamatorias, las cuales, segregan ROS y RNS responsables de que se desencadene la serie de reacciones que componen el proceso inflamatorio. El objetivo del proceso inflamatorio es aislar y destruir el agente extraño, evitando así que tejidos u órganos sanos puedan ser dañados, y que en el caso de un implante, puede finalizar con la encapsulación del mismo” [3].

La actividad neutralizadora de radicales, es conocida en el ámbito científico como *scavenging*, que proviene del inglés *scavenger*, que significa *carroñero*. Dicha propiedad ha sido estudiada y probada en superficies de óxido de titanio por otros autores, mediante el uso de un mediador de peroxinitrito incluso en presencia de proteínas en el medio [1, 2, 4]. También se ha probado dicha capacidad neutralizadora en capas de TiO_2 obtenido vía sol-gel. Sin embargo, el mecanismo por el que transcurre la neutralización de estas especies radicales por parte del TiO_2 es todavía desconocido.

En un primer momento el mecanismo trató de ser estudiado mediante la reacción de Fenton [5]. Posteriormente, otros autores propusieron que el mecanismo transcurría a través de reacciones de oxidación reducción en un proceso catalítico descrito por las siguientes reacciones (**R 5.1** a **R 5.4**) [4]:



Este mecanismo propuesto, implica cambios de fase, donde el TiO_2 se reduce a Ti_2O_3 . Dichas reacciones, requieren de unas condiciones reductoras muy agresivas [6], la cuales, no se dan en el medio fisiológico.

Sin embargo, sería coherente pensar que reacciones de oxidación reducción formen parte del proceso de neutralización de radicales, de la misma manera, que muchos procesos bioquímicos a nivel celular incluyen este tipo de reacciones en sus mecanismos. Algunos ejemplos son, el poder antioxidante que posee la Vitamina E, o el transporte de oxígeno en nuestra sangre a través de un complejo de hierro que se oxida y reduce dependiendo de las diferentes condiciones de los medios donde tienen lugar la unión de las moléculas de oxígenos o su descarga [7].

Por otro lado, el TiO_2 , como bien es sabido, es subestiquiométrico y, por tanto, debería ser formulado TiO_{2-x} [8]. Esto implica que el TiO_{2-x} posee una estructura cristalográfica donde existen defectos como vacantes de oxígeno compensados por la reducción parcial de Ti^{4+} a Ti^{3+} [3].

Si se une el hecho de que existen procesos biológicos que implican reacciones redox de biomoléculas en el medio fisiológico, con que en el TiO_2 el Ti se encuentra con mezal de estados de oxidación Ti^{+4} junto a Ti^{+3} debido a la compensación de vacantes de oxígeno, se podría plantear que dichos defectos estuvieran involucrados en el mecanismo de neutralización [3, 9]. Teniendo en cuenta, las fases de la serie Magnéli, la cuales se obtienen por reducción de TiO_2 , y que contienen Ti^{+4} y Ti^{+3} en su composición [8], podrían poseer esta propiedad de inhibición de la inflamación dotando a estos materiales de biocompatibilidad. Incluso se podría plantear que la razón de

$\text{Ti}^{4+}/\text{Ti}^{3+}$, jugase un papel importante en el mecanismo a nivel de variar la cinética o la termodinámica de la reacción o reacciones que forman parte del mecanismo de neutralización.

Otros parámetros pueden estar involucrados en el mecanismo. No se puede olvidar que el TiO_2 es un semiconductor, y posee un *Band Gap* con un valor de alrededor de 3.2 eV que varía según la fase cristalográfica en que se encuentra. En presencia de luz, para un semiconductor tipo “n”, la foto-oxidación se ve favorecida debido a la disgregación de los pares electrón-hueco [10]. De ahí, la aplicación del TiO_2 para fotocátalisis en depuración de aguas o desinfección de bacterias (más conocido por el término anglosajón *photo-killing*) [11-14]. No obstante, en oscuridad los electrones que se encuentran en la banda de conducción encuentran un nivel de energía más bajo, en el material denso, hasta el que caen “absorbidos” [10]. Las vacantes por su parte, sufren una fuerza opuesta y suben “bombeadas” hacia un nivel más superficial y más accesible por tanto a la interfase del material con el medio que lo rodea. Es entonces, cuando el material semiconductor pasa a mostrar un comportamiento reductor.

El TiO_2 se presenta en tres formas cristalográficas diferentes en la naturaleza: Brookita, Rutilo y Anatasa. El rutilo es más estable y denso que la anatasa. Además, presentan valores de *Band Gap* diferentes 3.2 eV en el caso de la anatasa y 3.0 eV en el caso del rutilo, por eso, cuando se presenta en esta estructura, la recombinación electrón-hueco es más rápida y el efecto fotocatalítico decrece. Sin embargo, y curiosamente, se ha comprobado que cierto porcentaje de rutilo en la composición del material de TiO_2 aumenta el efecto fotocatalítico. En la bibliografía [15], dos mecanismos teóricos tratan de explicar este efecto : el de separación de carga y el de antena. Ambos explican el aumento de la actividad fotocatalítica mediante un aumento en el tiempo de vida medio de par electrón-hueco. Sendos mecanismos se basan en tres hechos bien conocidos: el primero, que el *Band Gap* está relacionado de manera inversamente proporcional con el tamaño del nanocrystal; el segundo, que existe un tamaño crítico de cristal en la transformación anatasa-rutilo; el tercero y último, que en una muestra de TiO_2 en polvo nanocrystalino tendremos una combinación de partículas anatasa, con diferentes tamaños de cristal, y rutilo. En consecuencia, en una muestra en polvo con estas características, existen partículas de TiO_2 adyacentes con diferentes valores de *Band Gap*. Cuando se produzca un par electrón-hueco en una partícula, en

vez de producirse su recombinación inmediata y directa de electrones y huecos, estos irán cayendo a niveles de energía de partículas adyacentes con valores de *Band Gap* inferiores. De esta manera, quedan temporalmente “deslocalizados” y el tiempo de vida del par electrón-hueco aumenta. Por ello, un material en polvo nanocrystalino de TiO_2 rico en diversidad de tamaños de cristal poseerá un efecto fotocatalítico mayor. Esto implica que el material contenga partículas de anatasa en diferentes tamaños de partícula con un porcentaje óptimo de partículas rutilo.

La pregunta ahora sería, si estos parámetros juegan algún papel en el mecanismo de neutralización de radicales de la misma manera que en el efecto fotocatalítico. En este trabajo se hace un estudio de la actividad neutralizadora de radicales comparándola con: el porcentaje de cada fase en los materiales, el tamaño de partícula, la superficie específica, el *Band Gap* y la razón $\text{Ti}^{4+}/\text{Ti}^{3+}$.

5.2 Caracterización de las propiedades de los materiales en polvo que se relacionan con la actividad *scavenging*

Este apartado del trabajo trata en primer lugar de evaluar la actividad neutralizadora de radicales por parte de materiales de TiO_2 , y del TiO_2 reducido a Ti_5O_9 . Y además, evaluar la intervención de diferentes parámetros como el *Band Gap*, la razón rutilo/anatasa, el tamaño de partícula, la superficie específica y la mezcla de estados de oxidación $\text{Ti}^{4+}/\text{Ti}^{3+}$ en los materiales, en el mecanismo de neutralización.

Para el estudio de los materiales de TiO_2 , se hace uso de los siguientes materiales cerámicos en forma de polvos: TiO_2 recién preparado, TiO_2 calcinado a 200°C, 400°C, 600°C, 650°C, 700°C, 750°C. Los polvos de TiO_2 calcinado a 200°C y 400°C se plantearon para evaluar la actividad neutralizadora del TiO_2 anatasa con diferentes grados de cristalización. El porcentaje de cristalización se calculó en base a la señal más intensa de anatasa, de los espectros normalizados de DRX, considerando los polvos recién preparados 0% de cristalinidad y los calcinados a 600°C (temperatura a partir de la cual, la energía térmica se invierte en el cambio de fases) el 100% de cristalización. Los materiales en polvo de TiO_2 calcinados a diferentes temperaturas entre 600°C y 750°C se utilizan para evaluar la actividad neutralizadora del TiO_2 con diferentes porcentajes de rutilo en el material. Para ello, se calcula la proporción rutilo/anatasa existente en las muestras a partir de los difractogramas de rayos X

correspondientes, analizando el intervalo de 2θ (24-30°) donde se encuentran los picos más intensos de dichas fases para el TiO_2 , siguiendo el método descrito por A. Zachariah [15], tal y como se explicó en el Capítulo II. Además se usaron polvos comerciales como control y los seleccionados fueron TiO_2 anatasa #T8141#, TiO_2 rutilo #204757# y #634662#, de Aldrich. Cada cual, en base a su procesamiento posee unos valores de porcentaje de fases anatasa/rutilo, tamaño de partícula, superficie específica y *Band Gap* propios. Las **Tablas 5.1** y **5.2** resumen la caracterización de los materiales usados en los ensayos y que fue descrita ampliamente en el Capítulo III. A cada material se le asigna un código para facilitar la comprensión de las gráficas. El nombre incluye: la temperatura a la que ha sido calcinada la muestra en el caso de las preparadas en este trabajo, precedido de una S de muestra (en inglés, *sample*) o una CS de muestra comercial (*comercial sample*), caso en el que irá seguido de un número asignado (8, 9 ó 10), y el porcentaje de cristalinidad de la fase anatasa (en los casos correspondientes), precedido de una C, o el porcentaje de rutilo precedido de una R que implicará que el resto es de fase anatasa; se considera que a partir de 600°C la cristalización de la fase anatasa es del 100% y por tanto se eliminará del nombre.

Tabla 5.1 Resumen de los porcentajes de rutilo y anatasa y de cristalinidad en los materiales, así como de los códigos asignados a cada material.

Muestra	Código	% Anatasa	% Rutilo	% Cristalinidad
TiO_2 as prepared	S0-C0-R0	100%	0%	0
TiO_2 200°	S200-C16	100%	0%	50
TiO_2 400°	S400-C42	100%	0%	75
TiO_2 600°	S600-R23	77%	23%	100
TiO_2 650°	S650-R87	13%	87%	---
TiO_2 700°	S700-R97	3%	97%	---
TiO_2 750°	S750-R98	2%	98%	---
TiO_2 comercial T8141	CS8-R1	$\geq 99\%$	$\leq 1\%$	---
TiO_2 comercial 204757	CS9-R94	6%	94%	---
TiO_2 comercial 634662	CS10-R71	29%	71%	---

Tabla 5.2 Resumen de la superficie específica, el tamaño de partícula y el *Band Gap* en los materiales, así como de los códigos asignados a los mismos.

Muestra	Código	Superficie específica (m ² /g)	Distribución de tamaño de partícula (μm)	<i>Band-Gap</i> (eV)
TiO ₂ as prepared	S1-C0-R0	250	0.5-50	3.3
TiO ₂ 200°	S200-C16	111.2	2-30	3.4
TiO ₂ 400°	S400-C42	53.6	2-30	3.32
TiO ₂ 600°	S600-R23	10	0.5-50	3.1
TiO ₂ 650°	S650-R87	1.9	0.5-70	3.04
TiO ₂ 700°	S700-R97	1.2	0.5-70	3.03
TiO ₂ 750°	S750-R98	1.4	1-100	3.00
TiO ₂ comercial T8141	CS8-R1	9.5	0.2-1	3.38
TiO ₂ comercial 204757	CS9-R94	2	0.5-1	3.09
TiO ₂ comercial 634662	CS10-R71	24.2	2-3	3.33

Por último, se realizó la evaluación de la actividad neutralizadora del Ti₅O₉. También se estudió la posible relación del estado de oxidación en que se encuentra el titanio con el mecanismo de *scavenging*. Por un lado las fases de la serie de Magnéli, obtenidas de la reducción del TiO₂, poseen mezcla de estados de oxidación Ti³⁺ y Ti⁴⁺. El porcentaje en Ti³⁺ en las distintas fases irá en aumento cuanto mayor sea el grado de reducción, y así hasta llegar al Ti₂O₃ donde el Titanio se encuentra en estado de oxidación 3+. Incluso, en el TiO₂ se encuentran mezclas de estados de oxidación, ya que para compensar la existencia de defectos como vacantes de oxígeno (TiO_{2-x}), el Titanio se encuentra parcialmente reducido a Ti³⁺. Por ello, junto al Ti₅O₉ se estudiaron los polvos comerciales de Ti₂O₃ #481033#, TiO₂ anatasa #T8141#, TiO₂ rutilo #204757# y #634662#. También se evaluaron (CeO₂)_{0.98} (CaO)_{0.02} preparado por combustión y calcinado a 600°C y CeO₂ comercial #211575#, ya que la Ceria también contiene un pequeño porcentaje de cerio en estado de oxidación reducido Ce³⁺ debido a los defectos de oxígeno, como ocurría con el TiO₂. La **Tabla 5.3** resume la caracterización de los materiales usados en los ensayos. Dicha caracterización fue ampliamente descrita en el capítulo III, en el caso de los materiales de CeO₂ y en el Capítulo IV, en el del Ti₅O₉.

Tabla 5.3 Resumen de los estados de oxidación, la superficie específica, el tamaño de partícula y el *Band Gap* en los materiales.

Muestra	Estado de oxidación	Superficie específica (m ² /g)	Distribución de tamaño de partícula (μm)	<i>Band Gap</i> (eV)
Ti ₅ O ₉	Ti ⁴⁺ /Ti ³⁺	≤0.01	---	1.02
Ti ₂ O ₃ comercial	Ti ³⁺	0.4	10-50	1.62
CeO ₂ comercial	Ce ⁴⁺	9.5	0.2-1	3.38
211575	mayoritario			
(CeO ₂) _{0.98} (CaO) _{0.02}	Ce ⁴⁺ mayoritario	2	0.5-1	3.09

Como resumen de lo que se indica en el capítulo III, los rayos X (**Fig. 3.6**) de cada uno de los distintos materiales preparados de TiO₂ muestran que los polvos *recién preparados* eran amorfos, mientras que estos mismos calcinados a 200°C y 400°C muestran una única fase anatasa. Comparando los tres espectros se observa un aumento de la cristalinidad de los polvos con la temperatura de calcinación. Los difractogramas de los polvos calcinados entre 600°C y 750°C (**Fig. 3.7**) muestran mezcla de fases rutilo y anatasa al igual que los polvos comerciales. En todos los casos los porcentajes han sido calculados por el método anteriormente explicado [16] y que se han incluido de nuevo en la **Tabla 5.1**. Observando los porcentajes rutilo y anatasa obtenidos y las temperaturas de calcinación se ve que los porcentajes de rutilo aumentan con la temperatura, como era de esperar. También se caracterizaron los materiales comerciales de TiO₂ (**Fig. 3.13**), cuyas propiedades están directamente relacionadas con los métodos de síntesis y procesamiento que se hayan llevado a cabo para su obtención.

Por otro lado, se encuentran los materiales de CeO₂ y (CeO₂)_{0.98}(CaO)_{0.02} (**Fig. 3.34** y **3.35**), mostrando en ambos casos fase única de CeO₂. Y además están los polvos reducidos, donde el Ti₅O₉ se presenta como una fase mayoritaria.

La superficie específica está en relación con las temperaturas de calcinación, y de la misma manera que con las temperaturas usadas en los diferentes procesamientos cerámicos como la reducción, disminuye al aumentar dichas temperaturas. En el caso de

los polvos *recién preparados* la superficie específica es de $250 \text{ m}^2/\text{g}$ y disminuye con las temperaturas de calcinación a que se someten los materiales. El Ti_5O_9 es el que tiene una menor superficie específica, aunque no se ha podido determinar (es menor a $0.1 \text{ m}^2/\text{g}$) puesto que se encuentra por debajo del límite de detección, debido al agresivo tratamiento térmico al que se somete el TiO_2 para reducirlo. La distribución del tamaño de partícula, por el contrario, sigue una relación directa con estas temperaturas aumentando al aumentar las mismas. Todos estos resultados siguen una pauta lógica.

El *Band Gap* parece tener una relación con el porcentaje de rutilo debido al conocido efecto sinérgico que se explicó con anterioridad en la introducción de este capítulo [15]. Es por esto que en el TiO_2 , el *Band Gap* disminuye su valor cuanto mayor es el porcentaje de rutilo en la muestra. Pero también se sabe que en este efecto sinérgico intervienen otros parámetros como el tamaño de cristal. Por último, está el *Band Gap* de los polvos reducidos, que es menor que el de TiO_2 . El *Band Gap* del Ti_5O_9 es el menor de todos, ya que, aunque a temperatura ambiente su mecanismo de conducción es el de un semiconductor, su resistencia es muchísimo menor. En el caso del Ti_2O_3 , aumenta ligeramente con respecto al Ti_5O_9 , lo cual está dentro de la lógica, puesto que al llegar a la fase Ti_2O_3 la resistencia vuelve a aumentar de manera drástica [17] y además, también la estructura cristalográfica es distinta a partir de esta fase [6] (**Tabla 1.1**).

En el caso de los polvos comerciales TiO_2 anatasa #T8141#, TiO_2 rutilo #204757# y #634662#, las medidas de superficie específica, tamaño de partícula y *Band Gap*, no mantienen una relación directa con los resultados obtenidos para los materiales sintetizados en este trabajo. Esto es debido a que el procesamiento y tratamientos térmicos a que han sido sometidos son diferentes y son estos los que definen los valores de los parámetros mencionados como ya se ha explicado.

5.3 Ensayos de evaluación de la actividad *scavenging*

La evaluación de la actividad neutralizadora de radicales por parte de estos materiales se ha llevado a cabo mediante dos métodos diferentes: ensayo con 3-morpholinosisidnominina clorhídrico (SIN-1) [18, 19] y ensayo con 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazy radical (DPPH·) [20], que se explican a continuación.

5.3.1 Ensayo con SIN-1

Como ya se explicó en el Capítulo II el SIN-1 es un precursor del radical peroxinitrito, $\text{ONOO}\cdot$. Cuando dicho radical reacciona con una molécula de DCF da lugar a un compuesto coordinado fluorescente. Por tanto, la concentración de radical que no haya sido neutralizada reaccionará con dicho DCF para dar una señal de fluorescencia que será lo que se mida. Dichas medidas serán normalizadas con el máximo, que es la medida de fluorescencia de una solución con la concentración de SIN-1 que se añade a cada muestra sin verse reducida por la presencia de ningún material que lo neutralice. De esta manera se obtiene un porcentaje de fluorescencia que indica el porcentaje de radicales que permanecen en la disolución tras el periodo de incubación en que son parcialmente neutralizados. Este porcentaje se resta al 100%, obteniendo así lo que se denominará porcentaje de fluorescencia eliminado o porcentaje de radicales eliminados. Resumiendo, los materiales con altos porcentajes indican que han eliminado una mayor cantidad de radicales y viceversa. Este ensayo se realiza en condiciones que simulan a las fisiológicas, dando una idea más aproximada de lo que ocurre en condiciones reales trabajo.

La **Fig. 5.1** muestra estos resultados para los materiales de TiO_2 . Lo primero que se puede observar es que todos los materiales neutralizan radicales en mayor o menor medida. El material que mejor resultados muestra teniendo en cuenta todas sus propiedades en conjuntos el TiO_2 calcinado a 600°C (S600-R23) y después de él el TiO_2 recién preparado (S0-R0-C0), teniendo el primero una superficie específica, alrededor de 25 veces inferior al segundo. Entre los calciados a 200°C (S200-C16) y a 400°C (S400-C42) no se aprecian diferencias significativas. No obstante, las diferencias en superficie específica, y por tanto, superficie que esta reaccionando con los radicales, sí es notable, aproximadamente el doble. Lo mismo ocurre entre los calciados a 650°C , 700°C y 750°C (S650-R87, S700-R97, S750-R98). Entre ellos las diferencias no son

demasiado significativas, pero en este caso tampoco lo son las diferencias en sus superficies específicas. Este hecho se repite con los materiales comerciales (CS9- R94, CS10- R71) que a pesar de la diferencia en la superficie específica entre ambos, de un orden de magnitud, sus actividades neutralizadoras son muy similares. Sólo la muestra de anatasa comercial (CS8- R1), con un contenido mínimo de rutilo, presenta una ligera actividad inferior a los otros dos materiales comerciales. Cuando se normalizan estos resultados por los mg de muestra que se añaden en cada medida, las tendencias exhibidas en la **Fig. 5.1** se mantienen (**Fig. 5.2**), esto no es de extrañar ya que la variación en la cantidad de muestra en los diferentes ensayos es mínima.

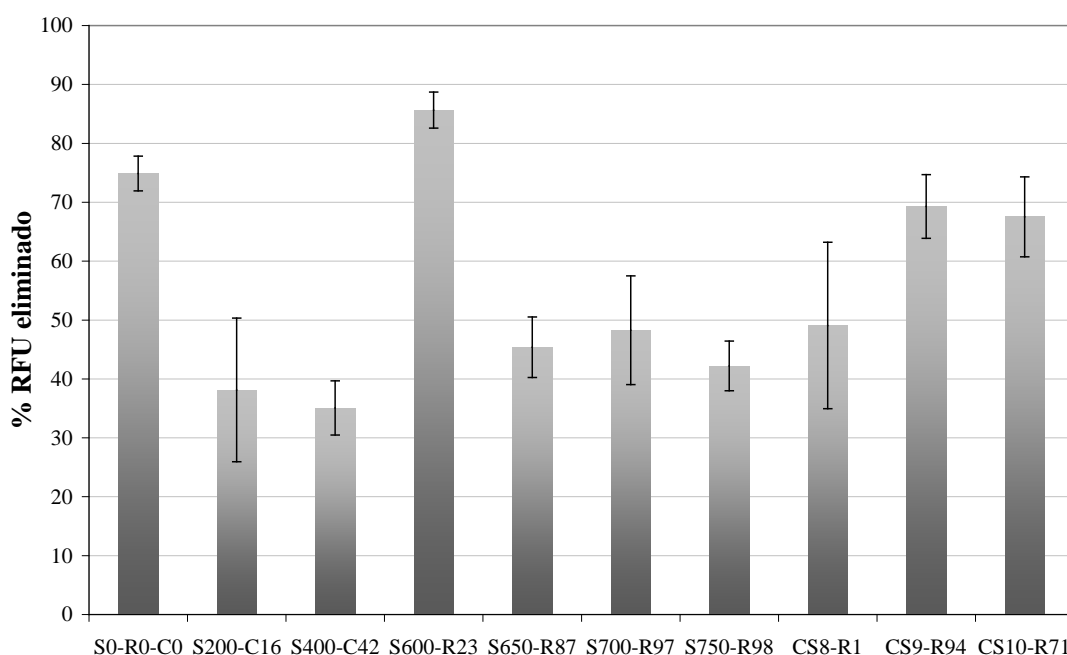


Fig. 5.1 Ensayo con SIN-1 donde se muestra el % de fluorescencia que es eliminada, es decir, el % de radicales eliminados por las muestras de TiO_2 obtenida por precipitación o recién preparada (S0-R0-C0), de esta calcinada a diferentes temperaturas (S200-C16 a S750-R98) y de muestras comerciales (CS8- R1, CS9- R94 y CS10- R71), utilizadas como control. Los nombres de cada muestra se completan con el % de rutilo de la muestra, precedido de una R o el % de cristalinidad de la anatasa de la muestra, precedido de una C.

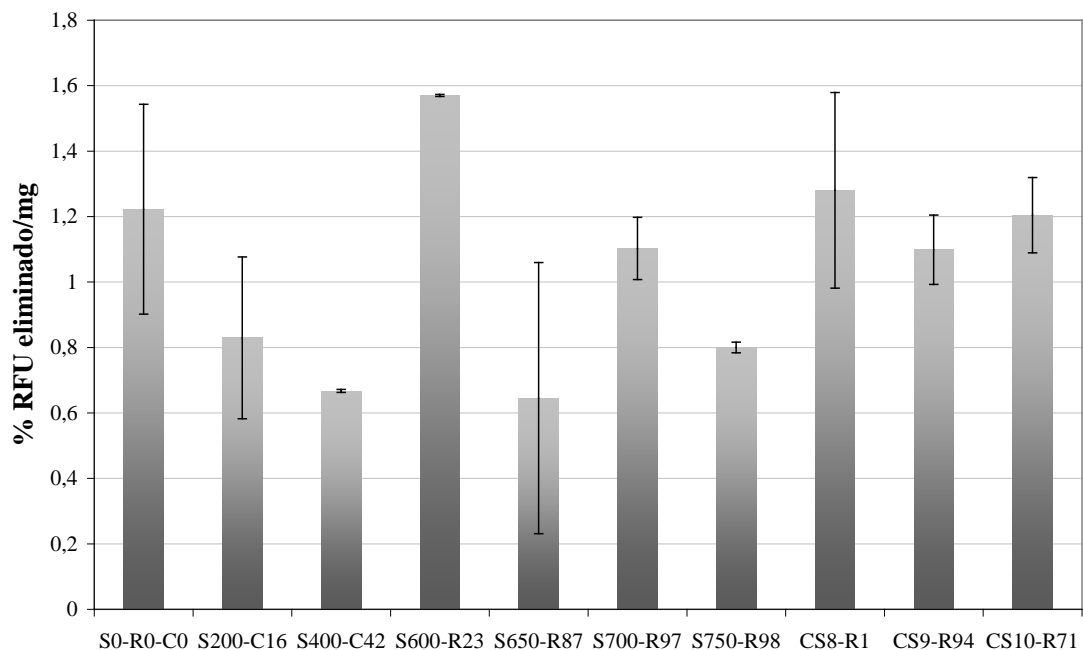


Fig. 5.2 Ensayo con SIN-1 donde se muestra el % de fluorescencia que es eliminada por mg de muestra empleado en el ensayo, es decir, el % de radicales eliminados por mg de muestra de TiO_2 obtenida por precipitación o *recién preparada* (S0-R0-C0), de esta calcinada a diferentes temperaturas (S200-C16 a S750-R98) y de muestras comerciales (CS8- R1, CS9- R94 y CS10- R71), utilizadas como control. Los nombres de cada muestra se completan con el % de rutilo de la muestra, precedido de una R o el % de cristalinidad de la anatasa de la muestra, precedido de una C.

De estos resultados se puede deducir, que puesto que algunos materiales tienen actividades muy similares, a pesar de sus diferentes superficies específicas, existirán otros parámetros que tengan más importancia en el mecanismo de neutralización. Por tanto, para intentar descubrir qué parámetro puede estar influyendo más en el *scavenging*, estos resultados van a ser normalizados a su vez por la superficie específica de cada cual (**Fig. 5.3**), y se intentarán relacionar con otros parámetros que varían según el material como el porcentaje de rutilo/anatasa, la cristalinidad de la anatasa y/o el *Band Gap*. Lo más resaltable es que por m^2 el que mayor actividad presenta es la muestra comercial MC9-R94 a pesar de ser una de las que menor superficie específica posee ($2 \text{ m}^2/\text{g}$), no obstante, es una de las que posee un porcentaje de rutilo mayor (94%) y un valor de *Band Gap* menor (3.09 eV).

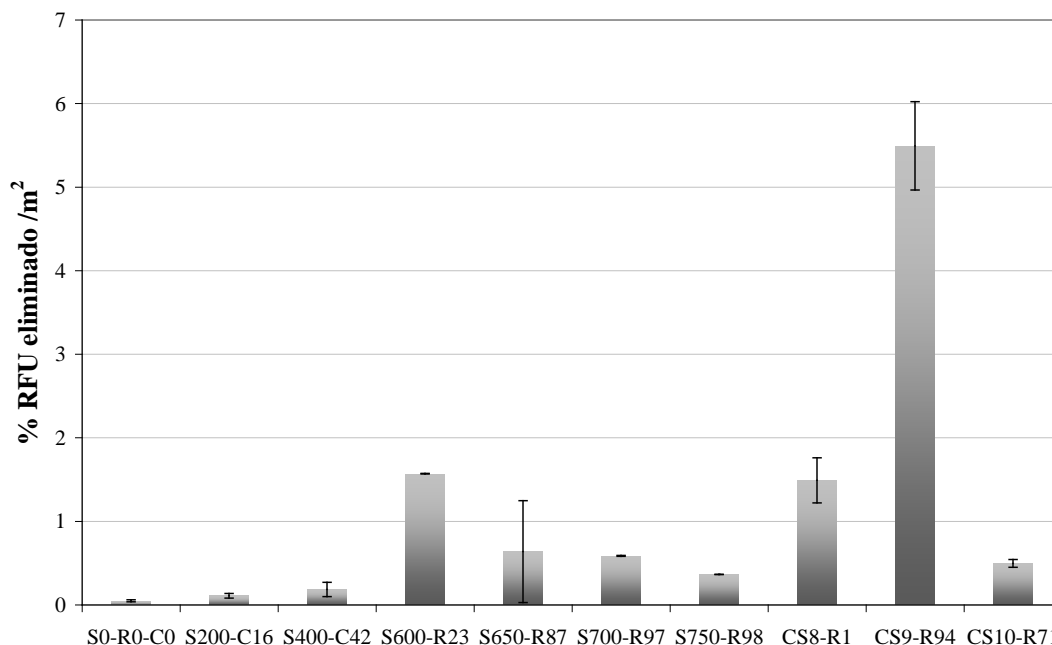


Fig. 5.3 Ensayo con SIN-1 donde se muestra el % de fluorescencia que es eliminada por m^2 , es decir, el % de radicales eliminados por m^2 de superficie específica de muestra de TiO_2 obtenida por precipitación o recién preparada (S0-R0-C0), de esta calcinada a diferentes temperaturas (S200-C16 a S750-R98) y de muestras comerciales (CS8- R1, CS9- R94 y CS10- R71), utilizadas como control. Los nombres de cada muestra se completan con el % de rutilo de la muestra, precedido de una R o el % de cristalinidad de la anatasa de la muestra, precedido de una C.

Eliminando el dato obtenido para el material CS9, con el fin de obtener una visión más detallada del resto se obtiene la **Fig 5.4**. En ella se observa que las muestras que presentan mayor actividad son TiO_2 calcinado a 600°C (S600-R23) y la anatasa comercial (CS8-R1) con actividades similares. El calcinado (S600) tiene un contenido en rutilo superior, 23% frente al 1% del comercial (CS8), y además un *Band Gap* inferior (3.1 eV de S600 frente a 3.38 eV de CS8).

Entre las muestras calcinadas a temperatura de 650°C y superior (S650-R87, S700-R97 y S750-R98) y el rutilo comercial CS10-R71 no existen muchas diferencias en la actividad. Las tres primeras poseen valores bajos de *Band Gap* (entre 3.0 y 3.04 eV) y elevados porcentajes de rutilo. En el caso de la muestra comercial CS10-R71 posee también un porcentaje alto de rutilo aunque no tan elevado como los anteriores, sin embargo, presenta un elevado valor de *Band Gap* (3.33 eV).

Con respecto a las muestras que sólo contienen anatasa en su composición (S0-R0-C0, S200-C16, S400-C42), a pesar de que las actividades son bajas, sí se puede observar un ligero aumento de la actividad con el aumento de la cristalinidad. Todas ellas se encuentran entre los materiales con elevados valores de *Band Gap* (entre 3.3 eV y 3.4 eV) de entre los estudiados.

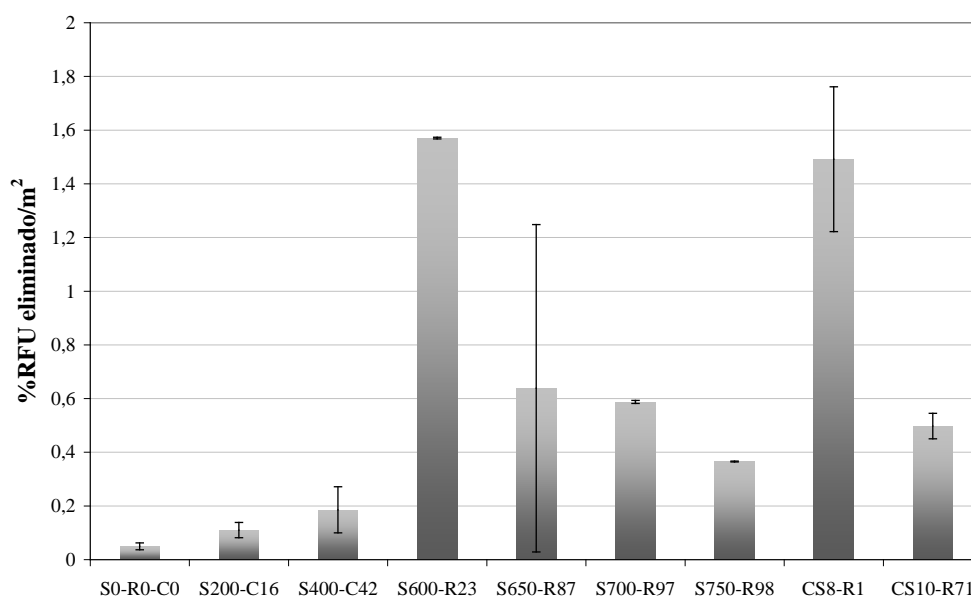


Fig. 5.4 Ensayo con SIN-1 donde se muestra el % de fluorescencia que es eliminada por m^2 , es decir, el % de radicales eliminados por cm^2 de superficie específica de muestra de TiO_2 obtenida por precipitación o *recién preparada* (S0-R0-C0), de esta calcinada a diferentes temperaturas (S200-C16 a S750-R98) y de muestras comerciales (CS8- R1, CS9- R94 y CS10- R71), utilizadas como control. Los nombres de cada muestra se completan con el % de rutilo de la muestra, precedido de una R o el % de cristalinidad de la anatasa de la muestra, precedido de una C

En general, se puede resumir que el aumento de la cristalinidad incrementa la actividad neutralizadora. Aún más importante el incremento que produce en esta actividad el contenido en rutilo en la composición del material. Tanto el aumento en la cristalinidad, como el aumento de rutilo en la composición de fases, implican una disminución en los valores de *Band Gap*. No obstante, y aunque no se puede afirmar categóricamente que valores de porcentaje de contenido en rutilo o *Band Gaps* favorecen la reacción, parece que la relación que estos parámetros siguen con la actividad fotocatalítica, también se mantiene con la actividad *scavenging*.

Por otro lado se estudiaron los materiales reducidos y los óxidos de cerio. Tanto el Ti_5O_9 como el $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ presentaron problemas para ser medidos por este método. No obstante se estudian los materiales comerciales de TiO_2 , CeO_2 y Ti_2O_3 . Mientras que los dos primeros presentan un estado de oxidación mayoritario de 4+ del Ti y el Ce, respectivamente, el Ti_2O_3 , posee principalmente Ti en estado de oxidación +3. El porcentaje de fluorescencia eliminada (**Fig. 5.5**), muestra simplemente una mayor actividad neutralizadora de los materiales de titanio respecto al de cerio, siendo, además, todas las actividades de los materiales de titanio muy parecidas. Las superficies específicas de todos ellos son muy diferentes como se puede comprobar en las **Tablas 5.2 y 5.3**. En la **Fig. 5.6** se muestran estos datos normalizados por los mg de muestra añadidos y las tendencias anteriormente comentadas se mantienen.

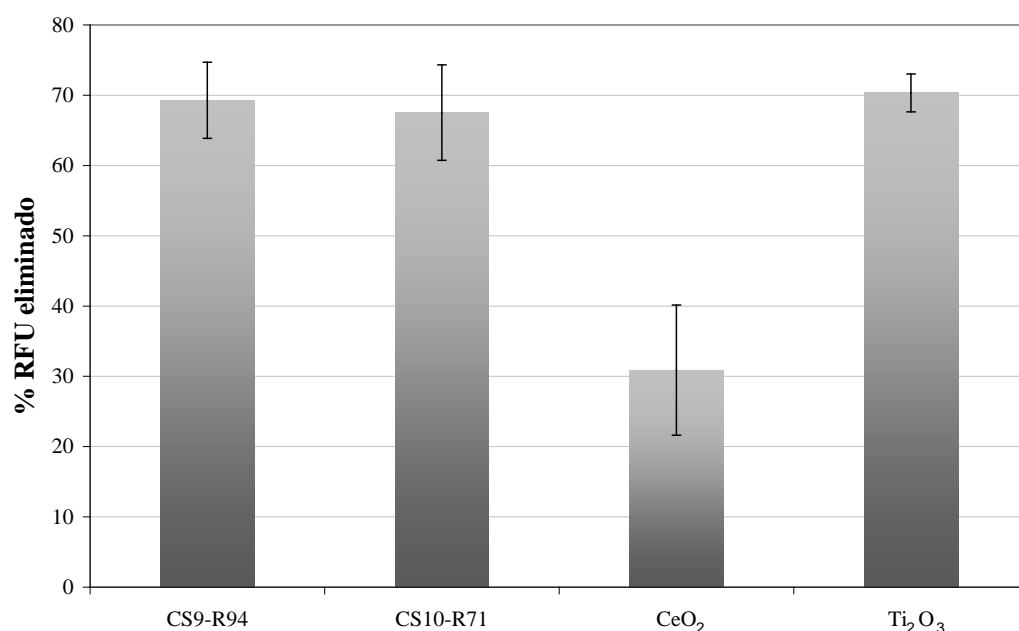


Fig. 5.5 Ensayo con SIN-1 donde se muestra el % de fluorescencia que es eliminada, es decir, el % de radicales eliminados por las muestras comerciales de TiO_2 (CS9 y CS10), CeO_2 , y Ti_2O_3 .

Al normalizar, además, por la superficie específica de cada material (**Fig. 5.7**), el Ti_2O_3 , donde el Ti se encuentra en su mayoría como Ti^{3+} , muestra una actividad muy superior al resto de materiales, donde el estado de oxidación predominante es 4+, ya sea cerio o titanio.

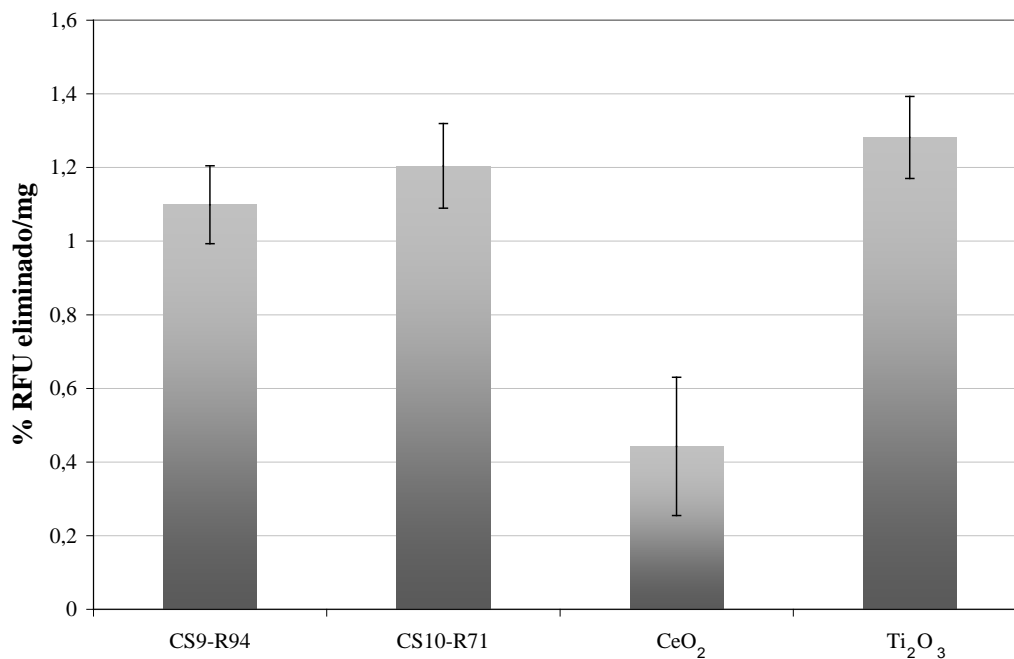


Fig. 5.6 Ensayo con SIN-1 donde se muestra el % de fluorescencia que es eliminada por, es decir, el % de radicales eliminados por mg de las muestras comerciales de TiO₂ (CS9 y CS10), CeO₂, y Ti₂O₃.

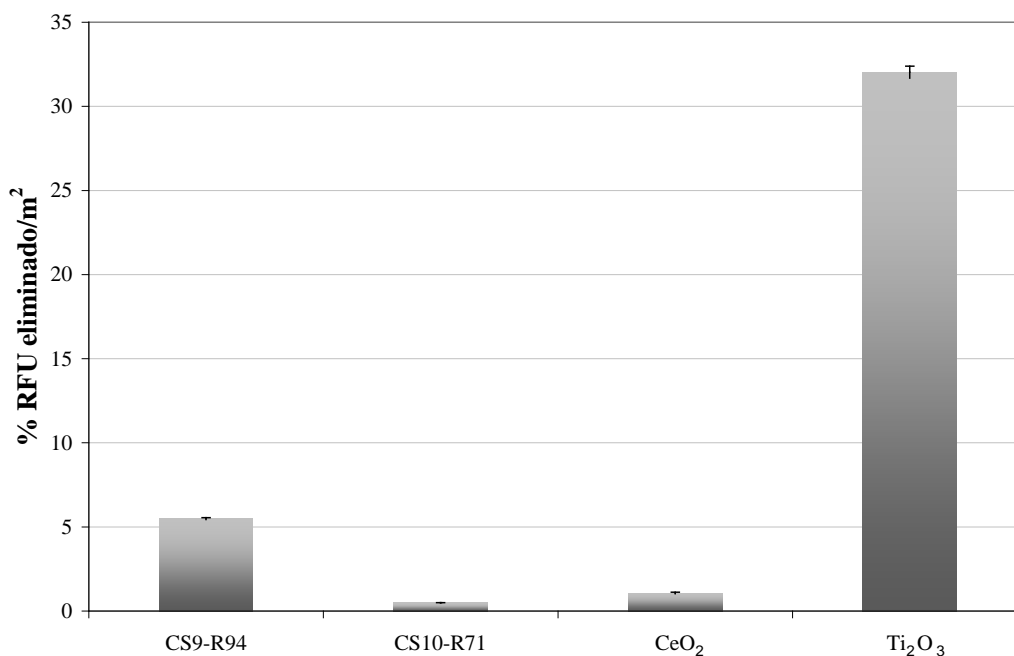


Fig. 5.7 Ensayo con SIN-1 donde se muestra el % de fluorescencia que es eliminada por m², es decir, el % de radicales eliminados por m² de las muestras comerciales de TiO₂ (CS9 y CS10), CeO₂, y Ti₂O₃.

Estas medidas parecen confirmar que el estado de oxidación tiene relevancia en el mecanismo de neutralización de radicales $\text{ONOO}\cdot$. Parece lógico pensar que las valencias en las que se encuentran los elementos de los materiales jueguen un papel importante en un mecanismo donde tiene lugar la reducción de una molécula reactiva como es un radical, existiendo un continuo cambio de estados de oxidación.

5.3.2 Ensayo con DPPH·

La actividad neutralizadora de especies reactivas se estudió también a través del método de DPPH·. Éste es un radical comercial semiestable, que disuelto en medio alcohólico forma una disolución de color morado (Capítulo II). Cuando el radical es neutralizado, la disolución torna a amarillo. Por tanto, las concentraciones del radical pueden ser medidas mediante espectroscopía UV-Vis a la λ máxima de absorción del compuesto (517nm). Al igual que en los ensayos anteriores, las medidas de absorbancia son divididas entre el máximo, que es la medida de absorbancia de la disolución en la concentración añadida a todas las muestras (0.1mM) pero sin ponerla en contacto con ningún material que la neutralice. El porcentaje obtenido se resta al 100% de absorbancia, obteniendo así la absorbancia eliminada, o lo que es lo mismo, el porcentaje de radicales eliminados. Dichas medidas serán relacionadas con los mismos parámetros que anteriormente: la superficie específica, el porcentaje rutilo-anatasa presente en la muestra o el *Band Gap*. Este método se realiza en un medio no fisiológico, no obstante, su coloración nos permite medir la concentración por UV-Vis y al tratarse de un radical semiestable, facilita las condiciones de trabajo. Este método, no se pudo usar para el TiO_2 recién preparado, puesto que presentaba problemas en la medición. Dicho material en polvo posee un tamaño de grano nanométrico y su química daba lugar a una muy buena dispersión de nanopartículas en el medio alcohólico, lo cual, dificultaba su sedimentación tras el proceso de incubación, causando interferencias en la medida.

Cuando se mide la absorbancia de las soluciones sobrenadantes que han estado en contacto con diferentes materiales de TiO_2 en polvo, se observa que todos ellos reducen la concentración de esta especie reactiva (**Fig. 5.8**). A simple vista, se ve que dos materiales presentan una mayor actividad que el resto, son los rutilos comerciales (CS9-R94 y CS10-R71). El resto de materiales presenta actividades algo inferiores pero

similares, no obstante, sus superficies específicas son muy diversas, al igual que sus valores de *Band Gap* y porcentajes de rutilo y de cristalinidad de la anatasa. La **Fig. 5.9**, muestra estas medidas normalizadas por mg de material, y las tendencias comentadas de la **Fig. 5.8** se mantienen.

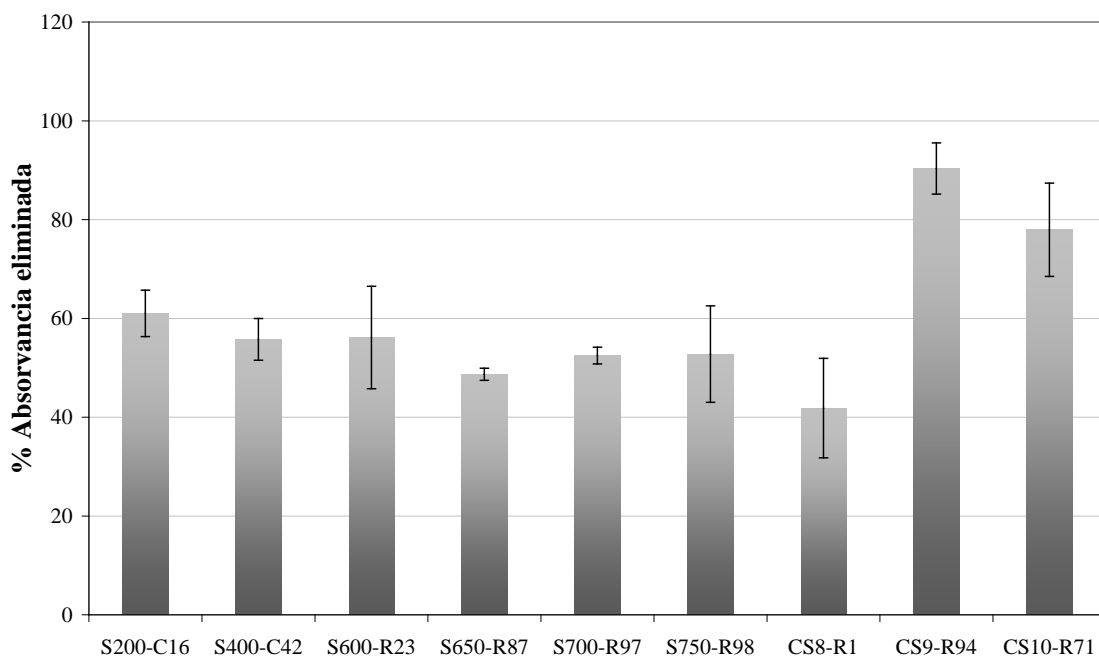


Fig. 5.8 Ensayo con DPPH· donde se muestra el % de absorbancia que es eliminada, es decir, el % de radicales eliminados por las muestras de TiO_2 obtenida por precipitación y calcinada a diferentes temperaturas (S200-C16 a S750-R98) y de muestras de TiO_2 comerciales (CS8-R1, CS9-R94 y CS10-R71), utilizadas como control. Los nombres de cada muestra se completan con el % de rutilo de la muestra, precedido de una R o el % de cristalinidad de la fase anatasa de la muestra, precedido de una C.

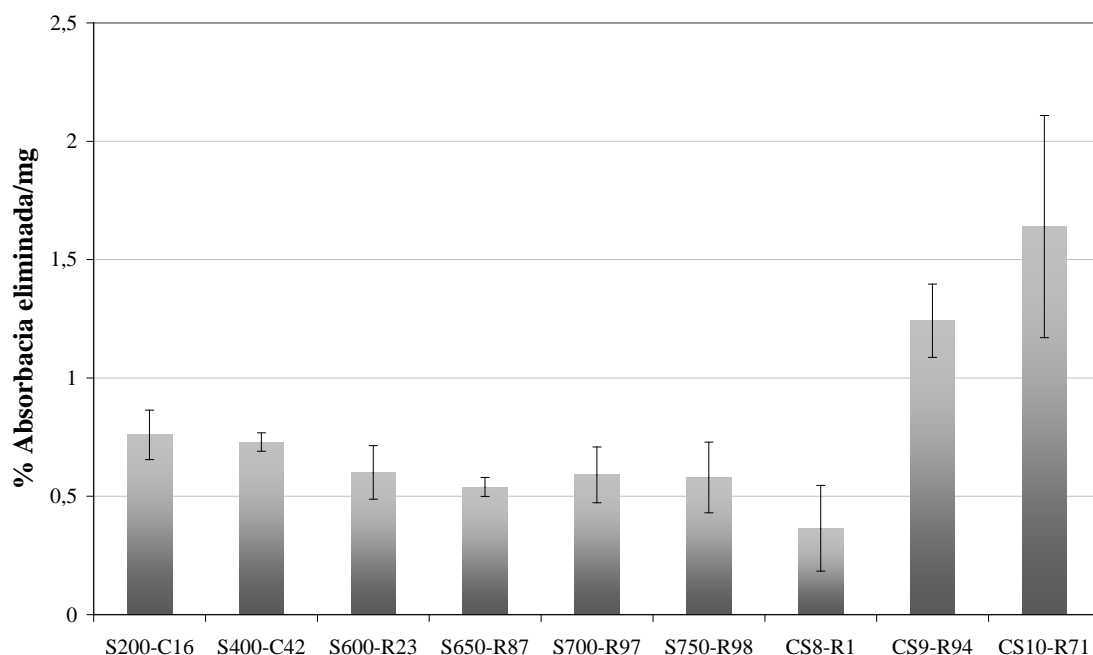


Fig. 5.9 Ensayo con DPPH· donde se muestra el % de absorbancia que es eliminada por mg de muestra, es decir, el % de radicales eliminados por mg de muestra de TiO_2 obtenida por precipitación y calcinada a diferentes temperaturas (S200-C16 a S750-R98) y de muestras de TiO_2 comerciales (CS8-R1, CS9-R94 y CS10-R71), utilizadas como control. Los nombres de cada muestra se completan con el % de rutilo de la muestra, precedido de una R o el % de cristalinidad de la anatasa de la muestra, precedido de una C.

Se normalizan estos resultados por la superficie específica correspondiente a cada material y se relacionan los resultados con el resto de propiedades, citadas anteriormente, de los mismos. De esta manera se obtiene la **Fig. 5.10**, donde se observa, en primer lugar que el material que presenta una mayor actividad por m^2 es el rutilo comercial MC9-R94, que contiene un elevado porcentaje de rutilo en su composición de fases (94%) y uno de los *Band Gaps* más bajos de los materiales de TiO_2 estudiados (3.09 eV). Esta actividad neutralizadora superior a la del resto de materiales de TiO_2 ya fue observada anteriormente en los ensayos de SIN-1. A continuación, los materiales que poseen una mayor actividad, detrás de éste, son los calcinados entre 650°C y 750°C (S650-R87, S700-R97 y S750-R98), todos ellos, al igual que en el caso anterior poseen elevados porcentajes de rutilo (desde 87% hasta el 98%) en la composición de fases, y entre los materiales de TiO_2 estudiados, son los que poseen menores *Band Gaps* (3.04

eV, 3.03 eV y 3.0 eV, respectivamente). A partir de aquí el resto de los materiales poseen actividades muy inferiores. Entre ellos son comparables las actividades del TiO₂ calcinado a 600°C (S600-R23), anatasa comercial (CS8-R1) y del rutilo comercial CS10-R71. El primero, *calcinado* a 600°C (S600-R23), posee un bajo porcentaje de rutilo (23%) y su *Band Gap* (3.1eV) no es muy elevado pero si es superior a los *Band Gaps* de todos los materiales que presentan mayores actividades por m² (S650-R87, S700-R97 y S750-R98). La anatasa comercial (CS8-R1), el más bajo de los porcentajes de rutilo entre los materiales que poseen rutilo en su composición, tiene el valor de *Band Gap* (3.38 eV), el segundo más elevado de entre todos los materiales de TiO₂ estudiados. El rutilo comercial CS10-R71, por su parte posee un alto porcentaje de rutilo en su composición de fases (71%), aunque inferior al de todas las muestras que presentaban actividades más elevadas, su *Band Gap* es elevado (3.3eV). Su actividad *scavenging* es comparable a la de S600-R23, con un contenido en rutilo (23%) y valores de *Band Gap* (3.1 eV) muy inferiores.

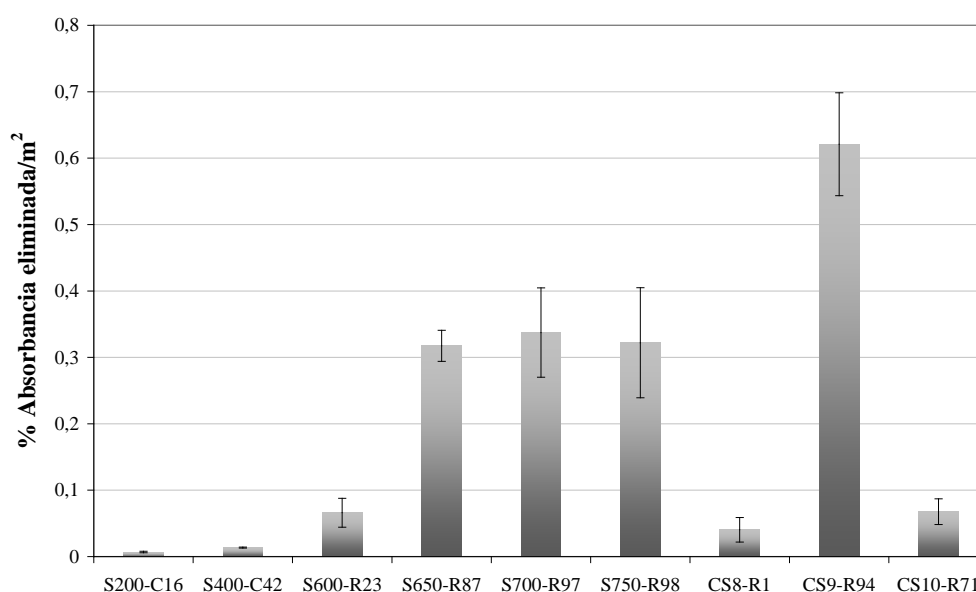


Fig. 5.10 Ensayo con DPPH· donde se muestra el % de absorbancia que es eliminada por m², es decir, el % de radicales eliminados por m² de superficie específica de muestra de TiO₂ obtenida por precipitación y *calcinada* a diferentes temperaturas (S200-C16 a S750-R98) y de muestras de TiO₂ comerciales (CS8-R1, CS9-R94 y CS10-R71), utilizadas como control. Los nombres de cada muestra se completan con el % de rutilo de la muestra, precedido de una R o el % de cristalinidad de la anatasa de la muestra, seguido de una C.

Por tanto, se pueden marcar unos límites de porcentaje de rutilo y de valores de *Band Gap* a partir de los cuales la actividad neutralizadora de los materiales en estas condiciones de trabajo aumenta. Para porcentajes de rutilo superiores al 87% y valores de *Band Gap* inferiores a 3.09 eV la actividad neutralizadora aumenta. Por el contrario, para porcentajes de rutilo inferiores al 71% y valores de *Band Gap* superiores a 3.1eV dicha actividad disminuye considerablemente. Esto se puede observar con claridad en al **Fig. 5.11**.

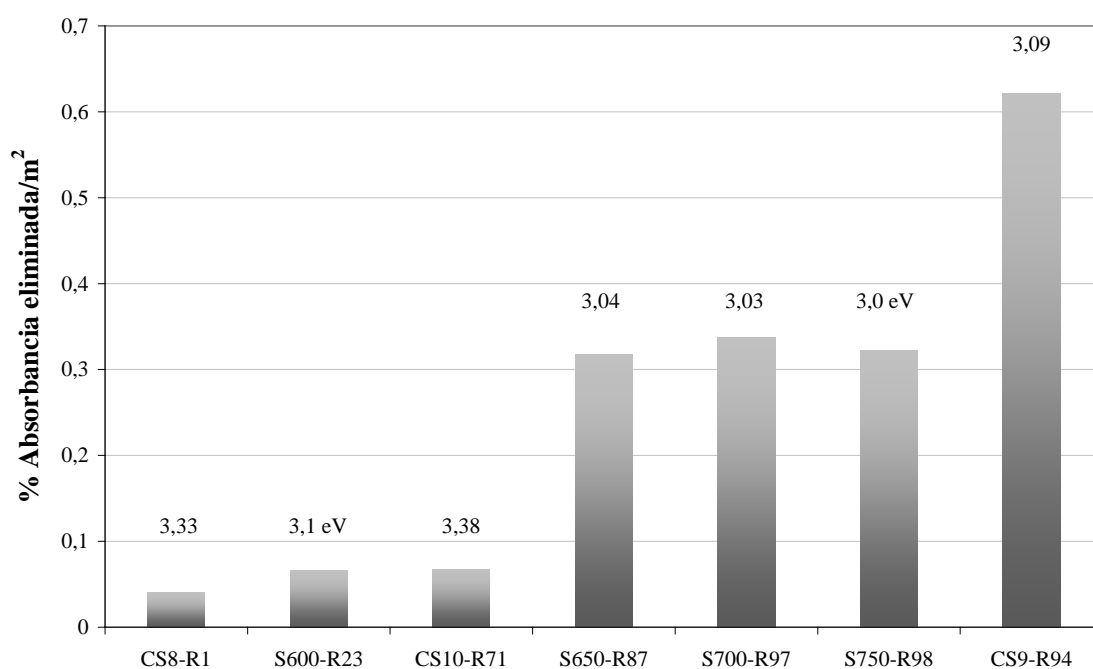


Fig. 5.11 Ensayo con DPPH· donde se muestra el % de absorbancia que es eliminada por m², es decir, el % de radicales eliminados por m² de superficie específica de muestra de TiO₂ *calcínadas* a diferentes temperaturas (S600-R23 a S750-R98) igual o superiores a 600°C y de muestras de TiO₂ comerciales (CS8-R1, CS9-R94 y CS10-R71), utilizadas como control. Los resultados se muestran en orden creciente de porcentaje de absorbancia eliminada, es decir, % de radicales eliminados. Los nombres de cada muestra se completan con el % de rutilo de la muestra, a continuación de la R y los valores de *Band Gap* se muestran sobre la barras.

Por otro lado, se realiza una ampliación de la **Fig. 5.10** (**Fig. 5.12**) para analizar el rol que juega el parámetro de la cristalinidad de la fase anatasa en la actividad de neutralización del radical DPPH· (calcínados a 200°C (S200-C16) y 400°C (S400-C42)). Además de los materiales mencionados, los cuales, presentan una única fase anatasa

donde la cristalinidad aumenta con la temperatura de calcinación, se incluye el material calcinado a 600°C (S600-R23), que se ha tomado como el 100% de cristalinidad. Como se puede observar en la **Fig. 5.12**, el aumento de la cristalinidad aumenta la actividad neutralizadora del material. Dicho aumento de la cristalinidad coincide con una disminución del *Band Gap* (**Tabla 5.2**). No obstante, y volviendo a la **Fig. 5.10**, el efecto de la cristalinidad no es tan importante como el contenido en fase rutilo en el material.

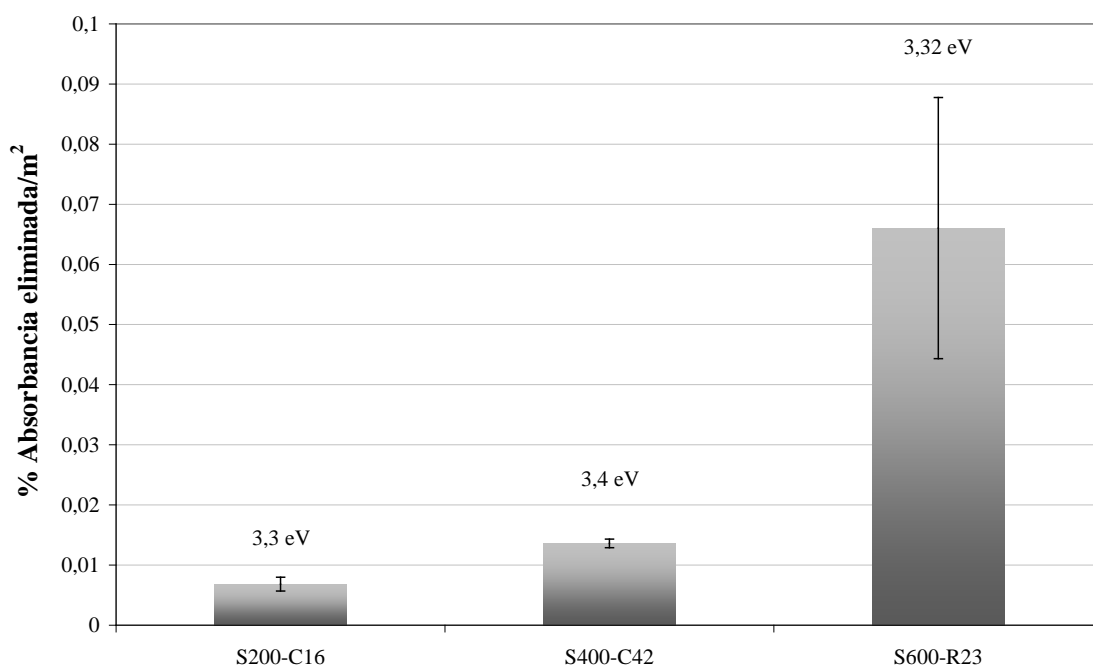


Fig. 5.12 Ensayo con DPPH· donde se muestra el % de absorbancia que es eliminada por cm², es decir, el % de radicales eliminados por cm² de superficie específica de muestras *calcinadas* a 200°C (S200-C16), 400°C (S400-C42) y 600°C (S600-R23). El % de cristalinidad de la fase anatasa de la muestra se indica en el código de la muestra precedido de una C. Los valores de Band Gap de los materiales se muestran sobre las barras.

Como se presenta en la bibliografía existe un efecto sinérgico de la cristalinidad y % rutilo/anatasa con el *Band Gap*, donde al aumentar los dos primeros, el tercero parece disminuir. Estos ensayos han relacionado estos parámetros con la actividad neutralizadora.

En la **Fig. 5.13** se comparan los siguientes materiales: anatasa comercial (CS8) rutilo comercial (CS9), Ti_5O_9 sintetizado en este trabajo, Ti_2O_3 comercial, CeO_2 comercial y $(\text{CeO}_2)_{0.98}(\text{CaO})_{0.02}$ sintetizado también en este trabajo. De los resultados obtenidos, se observa que en general los materiales de titanio tienen una mayor actividad que los de cerio, siendo la anatasa comercial (CS8-R1) la que presenta unos valores más similares a éstos últimos.

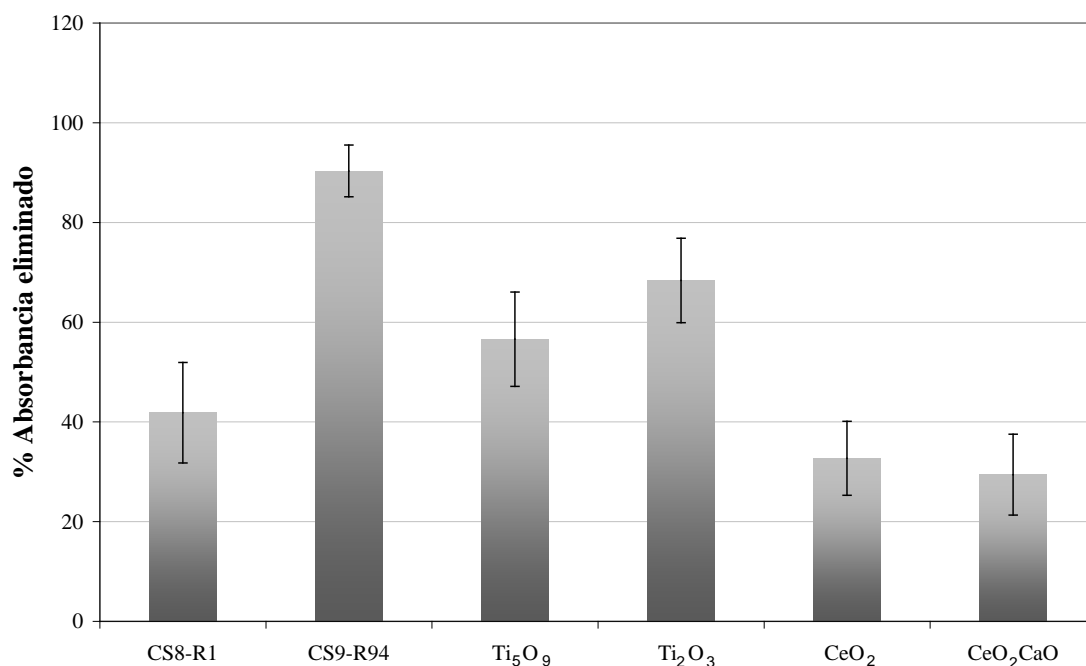


Fig. 5.13 Ensayo con DPPH· donde se muestra el % de absorbancia que es eliminada, es decir, el % de radicales eliminados por las muestras comerciales de TiO_2 (CS8 y CSC9), Ti_5O_9 preparada, Ti_2O_3 comercial, de CeO_2 comercial y CeO_2CaO sintetizada.

Si se compara entre los materiales de óxido de titanio, reducidos y sin reducir parece que las actividades *scavenging* son similares, en incluso la actividad neutralizadora del material oxidado CS9-R94, es superior a la de los reducidos (Ti_5O_9 y Ti_2O_3). No obstante sus superficies específicas son un orden de magnitud inferior. Cuando se normalizan los resultados por los gramos de material añadidos en el ensayo, se mantiene (**Fig 5.14**) la misma tendencia que en la **Fig. 5.13**.

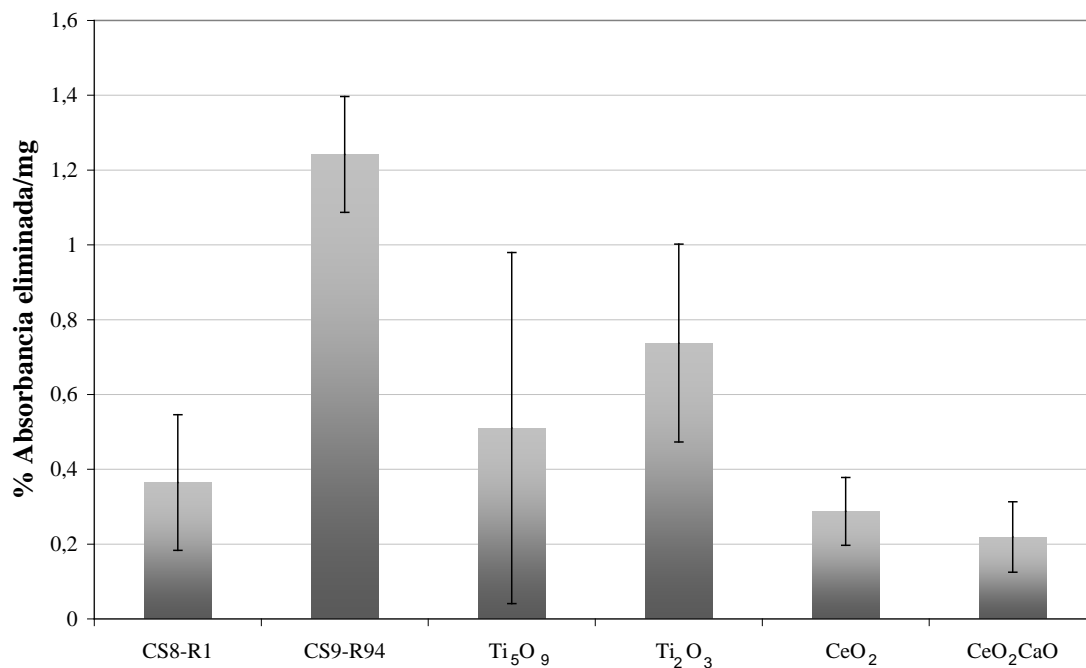


Fig. 5.14 Ensayo con DPPH· donde se muestra el % de absorbancia que es eliminada por mg, es decir, el % de radicales eliminados por mg de las muestras comerciales de TiO₂ (MC8 y MC9), Ti₅O₉ preparada, Ti₂O₃ comercial, de CeO₂ comercial y CeO₂CaO sintetizada.

Para eliminar el factor que añade la superficie específica a la actividad se normaliza cada material por su superficie específica (**Fig. 5.15**). De la representación del porcentaje de absorbancia por m² el material que tiene una actividad neutralizadora que destaca por encima del resto es el Ti₂O₃, el cual contiene mayoritariamente Ti³⁺. La actividad de este material supera incluso a la del rutilo comercial MC9-R94, que es el que mayor actividad por m² presentaba de todos los materiales de TiO₂. Además el *Band Gap* de este material reducido es muy bajo, 1.62 eV, comparado con el de los materiales de TiO₂ (iguales o superiores a 3.0 eV). El otro dato importante es la actividad del Ti₅O₉, que contiene mezcla de estados de oxidación Ti³⁺/Ti⁴⁺, que se encuentra a la par del rutilo comercial MC9-R94. El *Band Gap* de este material es 1.02 eV, inferior al del Ti₂O₃. El resto de materiales donde predomina el estado de oxidación +4 ya sea para titanio o cerio (MC8, CeO₂ y (CeO₂)_{0.98}(CaO)_{0.02}) poseen actividades muy inferiores.

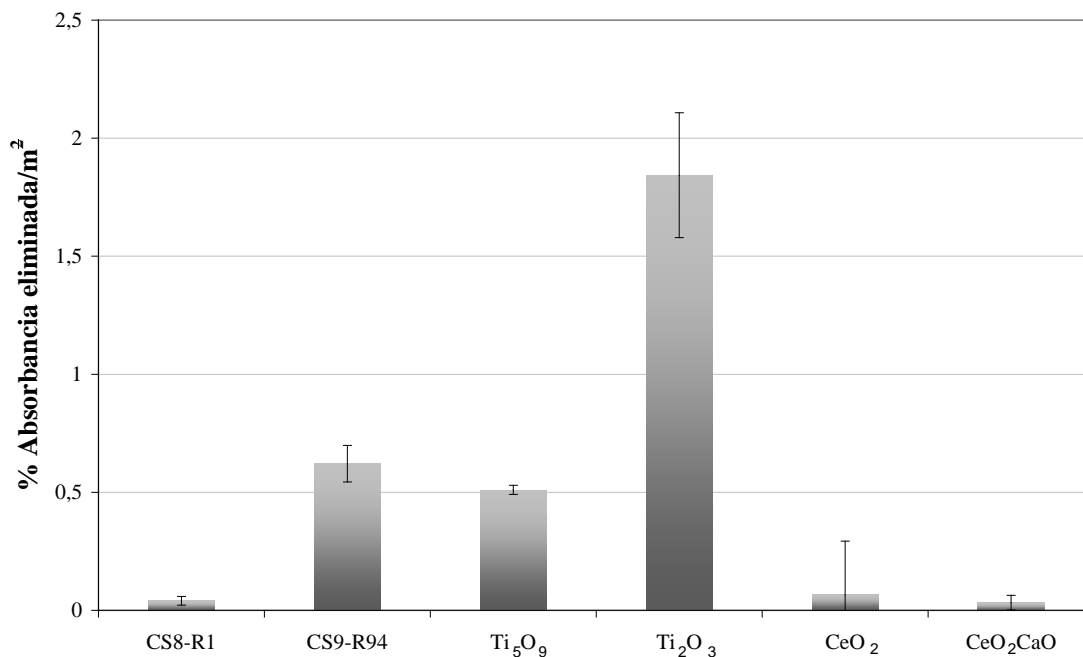


Fig. 5.15 Ensayo con DPPH· donde se muestra el % de absorbancia que es eliminada por m², es decir, el % de radicales eliminados por m² por las muestras comerciales de TiO₂ (CS8 y CS9), Ti₅O₉ preparada, Ti₂O₃ comercial, de CeO₂ comercial y CeO₂CaO sintetizada.

Por tanto, se podría decir que la presencia del estado de oxidación reducido +3 favorece la reducción de radicales DPPH·. Esto podría tener coherencia con el hecho que si el radical se reduce para neutralizarse, el neutralizador podría oxidarse en el proceso.

5.4 Conclusiones

Los óxidos de Titanio son capaces de neutralizar especies radicales como el ONOO·, que se puede encontrar en el organismo humano como consecuencia de un proceso inflamatorio, y además, lo hacen en condiciones que simulan a la fisiológicas.

Por este método además se obtienen tres conclusiones:

- ❖ Que el aumento de la cristalinidad y su correspondiente disminución de *Band Gap*, favorecen las reacciones de neutralización, por superficie específica, de especies reactivas tipo ONOO·.
- ❖ Que el contenido en rutilo en materiales de TiO₂, y la correspondiente disminución del *Band Gap*, también favorece dicha neutralización, de manera aún más significativa que la cristalinidad.
- ❖ Que el Ti³⁺, es decir, en estado reducido, aumenta la actividad neutralizadora, por superficie específica, incluso más que el parámetro de contenido en rutilo.

Los resultados del estudio de la relación de parámetros como, porcentaje en la mezcla de fases rutilo/anatasa, grado de cristalinidad, *Band Gap*, y porcentaje de Ti³⁺/Ti⁴⁺ llevado a cabo con el radical sintético y semiestable DPPH· concluyen:

- ❖ Los materiales de TiO₂ que sólo contienen fase anatasa aumentan la concentración de DPPH· eliminado por m² cuando aumenta su grado de cristalinidad, al aumentar la temperatura a que fueron calcinados.
- ❖ Los materiales con mezcla de fases rutilo/anatasa neutralizan mayor concentración de DPPH· por m² que un material compuesto exclusivamente por anatasa. Además, los materiales que tienen un porcentaje de rutilo superior al 87% y valores de *Band Gap* inferiores a 3.1 eV eliminan una concentración de DPPH· mucho mayor que los que contienen un porcentaje de rutilo inferior al 71% y sus valores de *Band Gap* son superiores a 3.1eV.
- ❖ El titanio en estado de oxidación 3+, favorece la reacción de neutralización del DPPH·, igual que en el caso del radical ONOO·. El Ti₅O₉, presenta una actividad muy superior a la mayoría de óxidos de titanio estudiados en este capítulo, siendo sólo comparable al rutilo comercial MC9-R94. Por su parte, el Ti₂O₃, donde el titanio se encuentra mayoritariamente en estado de oxidación +3

demostró eliminar una concentración de DPPH· por m² superior a cualquier otro material aquí estudiado.

Bibliografía

1. Suzuki, R. and J.A. Frangos, *Inhibition of inflammatory species by titanium surfaces*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2000(372): p. 280-289.
2. Suzuki, R., J. Muyco, J. McKittrick and J.A. Frangos, *Reactive oxygen species inhibited by titanium oxide coatings*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2003. **66**(2): p. 396-402.
3. Berta Moreno, M.C., J.R. Jurado, E. Chinarro, *Una revisión del uso de TiO₂ en terapias e ingeniería tisular*. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2009. **48** (6): p. 321-328.
4. Sahlin, H., R. Contreras, D.F. Gaskill, L.M. Bjursten and J.A. Frangos, *Anti-inflammatory properties of micropatterned titanium coatings*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2006. **77**(1): p. 43-49.
5. Tengvall, P., H. Elwing, L. Sjöqvist, I. Lundström and L.M. Bjursten, *Interaction between hydrogen peroxide and titanium: A possible role in the biocompatibility of titanium*. Biomaterials, 1989. **10**(2): p. 118-120.
6. Hayfield, P.C.S., *Development of a New Material Monolithic Ti₄O₇ EBONEX® Ceramic*. Royal Society of Chemistry, 2002 **Chapter 2**: p. 9-46.
7. Zequería, D.E.B., *Vitáminas y oxidoreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo*. Revista Cubana de Investigación Biomédica, 2006. **25**.
8. Liborio, L. and N. Harrison, *Thermodynamics of oxygen defective Magnéli phases in rutile: A first-principles study*. Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics, 2008. **77**(10).
9. Contreras, R., H. Sahlin and J.A. Frangos, *Titanate biomaterials with enhanced antiinflammatory properties*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2007. **80**(2): p. 480-485.
10. Zoski, C.G., *Chapter 9: Semiconductor Electrodes*. Handbook of electrochemistry: p. 329-389.
11. Fujishima, A., R.X. Cai, J. Otsuki, K. Hashimoto, K. Itoh, T. Yamashita and Y. Kubota, *Biochemical application of photoelectrochemistry: photokilling of malignant cells with TiO₂ powder*. Electrochimica Acta, 1993. **38**(1): p. 153-157.
12. Huang, N.P., M.H. Xu, C.W. Yuan and R.R. Yu, *The study of the photokilling effect and mechanism of ultrafine TiO₂ particles on U937 cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1997. **108**(2-3): p. 229-233.
13. Huang, N., Z. Xiao, D. Huang and C. Yuan, *Photochemical disinfection of Escherichia coli with a TiO₂ colloid solution and a self-assembled TiO₂ thin film*. Supramolecular Science, 1998. **5**(5-6): p. 559-564.
14. Xu, M., N. Huang, Z. Xiao and Z. Lu, *Photoexcited TiO₂ nanoparticles through ·OH- radicals induced malignant cells to necrosis*. Supramolecular Science, 1998. **5**(5-6): p. 449-451.
15. Zachariah, A., K.V. Baiju, S. Shukla, K.S. Deepa, J. James and K.G.K. Warner, *Synergistic effect in photocatalysis as observed for mixed-phase nanocrystalline titania processed via sol-gel solvent mixing and calcination*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(30): p. 11345-11356.
16. Van Leeuwen, R.A., C.J. Hung, D.R. Kammler and J.A. Switzer, *Optical and electronic transport properties of electrodeposited thallium(III) oxide films*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(41): p. 15247-15252.

17. Smith, J.R., F.C. Walsh and R.L. Clarke, *Electrodes based on Magnéli phase titanium oxides: The properties and applications of Ebonex[®] materials*. Journal of Applied Electrochemistry, 1998. **28**(10): p. 1021-1033.
18. Kehr, J., T. Yoshitake, F.H. Wang, D. Wynick, K. Holmberg, U. Lendahl, T. Bartfai, M. Yamaguchi, T. Hökfelt and S.O. Ögren, *Microdialysis in freely moving mice: Determination of acetylcholine, serotonin and noradrenaline release in galanin transgenic mice*. Journal of Neuroscience Methods, 2001. **109**(1): p. 71-80.
19. Leggas, M., Y. Zhuang, J. Welden, Z. Self, C.M. Waters and C.F. Stewart, *Microbore HPLC method with online microdialysis for measurement of topotecan lactone and carboxylate in murine CSF*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. **93**(9): p. 2284-2295.
20. Molyneux, P., *The use a stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for stimating antioxidant activity*. Songklanakarin J. Sci. Technol, 2004. **26**: p. 211-219.

Capítulo VI

VI Estudio del mecanismo de neutralización de radicales

6.1 Introducción

En el Capítulo I de Introducción se hizo una breve revisión bibliográfica de la capacidad que posee el TiO_2 para neutralizar los radicales libres que se producen durante un proceso inflamatorio, y gracias al cual, se considera un material biocompatible candidato para inhibir los mecanismos inflamatorios. En dicha bibliografía se sugiere, de acuerdo con algunos autores, que el mecanismo por el cual el TiO_2 lleva a cabo el proceso de neutralización, transcurre mediante reacciones de oxidación-reducción del en el sistema Ti-O, en el que conviven los estados de oxidación +3 y +4 dentro del mismo compuesto. En base a esto, se plantea que las fases de la serie de Magnéli, las cuales también poseen Ti con ambos estados de oxidación, puedan poseer poder neutralizador de igual manera. Posteriormente, en el Capítulo V se evaluaron las actividades neutralizadoras de varios de los materiales usados en este trabajo, entre ellos las fases de la serie de Magnéli. Dichos materiales resultaron poseer una capacidad neutralizadora incluso superior a la del TiO_2 .

Por otro lado, estas fases de la serie de Magnéli, Ti_4O_7 , son materiales que, por sus propiedades, tanto eléctricas como electroquímicas, se han propuesto como materiales para electrodo, y prueba de esto es la extensa bibliografía que existe al respecto y que fue descrita en la Introducción. En el capítulo IV, Materiales para electrodo en biomedicina se hizo una minuciosa caracterización de estos materiales, cuya síntesis y procesamiento ha formado parte también de este trabajo.

Al unir las propiedades como electrodo de las fases de la serie de Magnéli y a su probada capacidad para neutralizar moléculas radicales nació la idea de estudiar el mecanismo de neutralización de radicales por parte de estos materiales mediante métodos electroquímicos. En la literatura aparecen algunos trabajos sobre estudios electroquímicos de la molécula radical sintética y semiestable DPPH· [1-4]. También, otros autores, usan este método electroquímico para el estudio de especies con propiedades antioxidantes o la actividad oxidante en medios biológicos por parte de especies reactivas como son los radicales [5-7]. En este trabajo, en primer lugar se plantea el estudio mediante VC, en cuya celda se usará como electrodo de trabajo un electrodo de Ti_4O_7 y como medio de reacción una disolución de DPPH·. Como parte de la inspiración de estos ensayos surgió también la idea de usar el método de ruido electroquímico (ECN, electrochemical noise), el cual, es muy usado en estudios de corrosión [8, 9]. Este método tiene la ventaja de que es capaz de registrar los cambios de potencial e intensidad que tienen lugar en la celda sin que sea necesaria una señal de entrada [10], como ocurre con la VC, y que puede promover reacciones que en ausencia de señal eléctrica, no ocurrirían. En este método electroquímico las reacciones de oxidación o reducción en la celda de trabajo se traducen en cambios de potencial e intensidad de corriente.

Además para consolidar la interpretación de los ensayos electroquímicos es necesario estudiar los cambios que provoca un proceso de neutralización de radicales tanto en el material que neutraliza como en el medio que contiene los radicales neutralizados.

6.2 Caracterización de los materiales

En primer lugar, es necesario observar los posibles cambios que pudiera sufrir el material, si es que los hay, tras un proceso de neutralización de radicales. Es por ello que se usaron diferentes técnicas en la caracterización (DRX y medida del Band Gap por UV-Vis) de los materiales estudiados, antes y después de someterlos a un periodo de incubación en una disolución de un radical sintético y semiestable, ya usado en otros ensayos incluidos en este trabajo, el DPPH \cdot . También se caracterizaron, mediante las técnicas correspondientes las disoluciones implicadas en el ensayo, antes y después de los procesos de incubación. Las disoluciones de DPPH \cdot en Isopropanol empleadas en los ensayos se encuentran en una concentración de 3Mm. El periodo de incubación fue de 3 semanas (21 días), el cual, se llevó a cabo en total ausencia de luz.

6.2.1 Espectroscopía Uv-Vis

En primer lugar, se caracterizan las disoluciones en las que se incubaron los materiales con dos fines: primero, verificar que el DPPH \cdot ha sido reducido a DPPH $_2$, y por tanto, neutralizado [11]; realizar un estudio, a *posteriori*, de los posibles cambios que hayan podido tener lugar en el material. Ya se explicó en el Capítulo V donde se realizaron ensayos con DPPH \cdot , que la reducción de este radical conlleva un cambio en la coloración de la disolución que se aprecia a simple vista. Este cambio en la coloración se debe a que el máximo de absorbancia que caracteriza al DPPH \cdot a 517 nm, desaparece en el espectro cuando el DPPH $_2$ se forma [11]. Esto es lo que ocurre en los ensayos realizados en este trabajo y se ilustra en la **Fig. 6.1**.

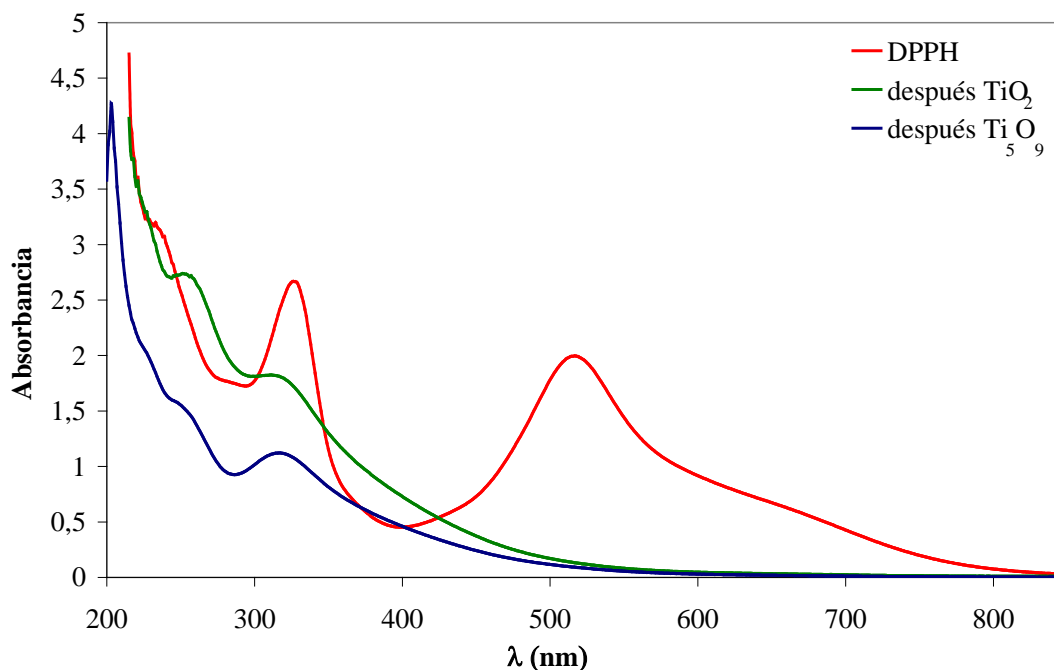


Fig. 6.1 Espectroscopía Uv-Vis a) DPPH· 3mM antes del proceso de neutralización (rojo) b) después de la incubación de TiO_2 en polvo *calcinado* a 600°C (verde) y c) después de la incubación de Ti_5O_9 en polvo (azul) durante 21 días.

La disolución 3mM de DPPH·, previa a la incubación muestra la banda a 517nm. Pero una vez ha sido incubada en los materiales en polvo TiO_2 *calcinado* a 600°C y Ti_5O_9 , y tras 21 días se mide su absorbancia de nuevo, para lo cual, la suspensión se centrifuga y se toma una parte alícuota del sobrenadante, el pico de absorbancia a 517 nm ha desaparecido. Esto era ya previsible antes de la medición puesto que el color de la disolución había cambiado del color morado al amarillo.

6.2.2 DRX

Tras verificar que los radicales han sido neutralizados se procede a estudiar las posibles consecuencias que dicha neutralización ha tenido sobre el material. Para ello, se caracterizaron los materiales en polvo mediante DRX antes y después del periodo de incubación. Se eligieron para estos ensayos los materiales en polvo debido a que al tener una mayor superficie de reacción se le supone una mayor capacidad de neutralización al presentar mayor superficie de contacto con los radicales, y sería relativamente sencillo detectar cambios que pudieran producirse en dicho material. En la **Fig. 6.2** se ve cómo el material en polvo de TiO_2 no sufre ningún cambio de fase apreciable durante el

proceso de incubación. Tanto antes como después del proceso de incubación el TiO_2 calcinado a 600°C se muestra en fase anatasa. Por otro lado, se estudian los materiales reducidos. En la **Fig 6.3** se presenta el espectro por DRX del material en polvo reducido que revela una composición mayoritaria de Ti_5O_9 , con una pequeña mezcla de Ti_6O_{11} . Dichas fases no sólo se mantienen tras el proceso de incubación sino que la relación entre las intensidades de sus picos no se modifican, lo cual es indicativo de que la concentración de dichas fases tampoco varía. No obstante, hay que tener en cuenta el límite de detección del análisis por DRX, el cual, no sería capaz de detectar, por ejemplo, la formación de una nueva fase a nivel superficial que no superase el 2% de la composición total.

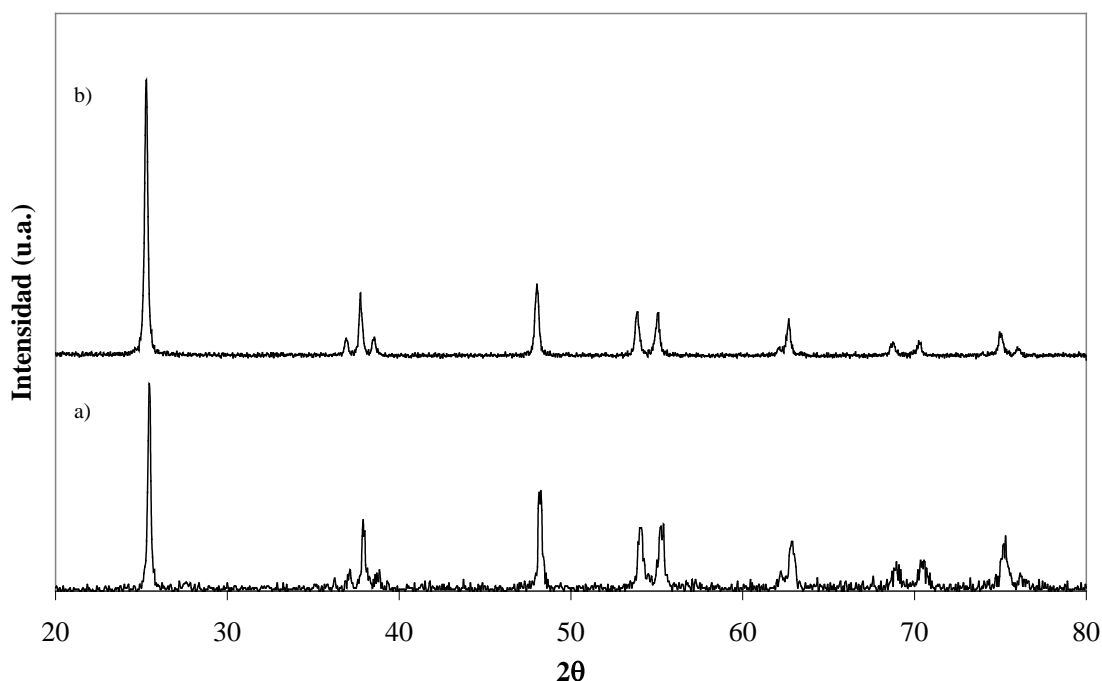


Fig. 6.2 DRX de el material en polvo de TiO_2 a) antes y b) después de un proceso de incubación en una disolución de DPPH· 3mM durante 21 días en oscuridad.

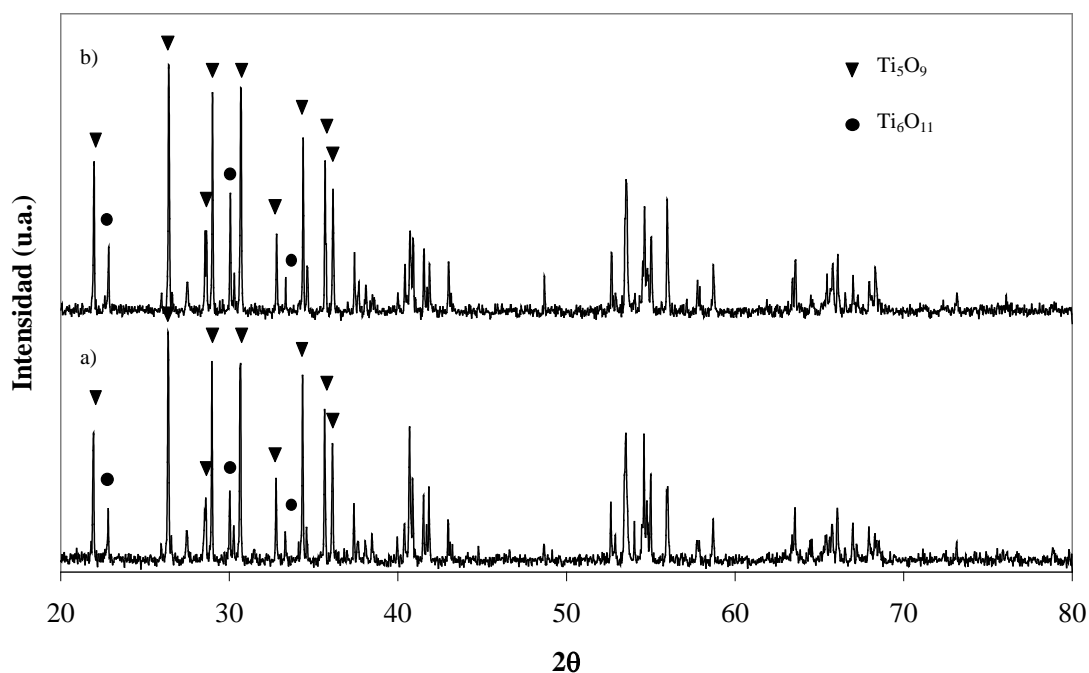


Fig. 6.3 DRX de el material en polvo de Ti_5O_9 a) antes (azul) y b) después (rojo) de un proceso de incubación en una disolución de DPPH· 3mM durante 21 días en oscuridad.

6.2.3 Medidas del *Band Gap*

Puesto que en el proceso de incubación el DPPH· se reduce, es lógico pensar que otro componente del sistema se tiene que oxidar. Un cambio en la oxidación del material, así como la formación de una capa de óxido importante en la superficie, por ejemplo provocada por un proceso de pasivación, podrían ser detectadas mediante la medida de su *Band Gap*. Respecto al Ti_5O_9 sintetizado y procesado durante este trabajo, se comporta como un material tipo semiconductor a temperatura ambiente (según el mecanismo mostrado en la **Fig. 4.11**) por lo que su *Band Gap* puede ser medido. Dicho *Band Gap* aumentará con la oxidación del material. En este caso, el experimento se realizó en las muestras en polvo y en los discos densos, ya que es en esta forma como van a estar conformados cuando actúen como electrodos. En el caso del TiO_2 lo que se pretende encontrar sería un cambio en el estado de oxidación del Ti superficial. También se estudia su *Band Gap* antes y después de la incubación. En la **Tabla 6.1** se muestran los valores de *Band Gap* obtenidos mediante los cálculos realizados a partir de las medidas obtenidas en Uv-Vis transformadas según Kubelca-Munt (como se explica en el Capítulo III de Materiales y Métodos).

Tabla 6.1 *Band Gaps* de los materiales en polvo TiO_2 y Ti_5O_9 y discos densos de éstos últimos, antes y después de un proceso de incubación en una disolución de $\text{DPPH}\cdot$ 3mM durante 21 días en oscuridad

Band Gap (eV)		Antes de $\text{DPPH}\cdot$	Después de $\text{DPPH}\cdot$
Polvos	TiO_2	3,29	3,30
	Ti_5O_9	1,02	1,07
Discos Densos	Ti_5O_9	1,488	1,489

Tanto en los materiales de TiO_2 como los de Ti_5O_9 , ya estén conformados en polvo o discos densos, no se encontraron diferencias significativas en las medidas de los *Band Gaps* que pudieran sugerir verdaderamente la formación de un óxido, o cualquier cambio en el estado de oxidación que fuese lo suficientemente importante para modificar el valor del intervalo de energías prohibidas entre las bandas de valencia y conducción de los materiales estudiados.

6.3 Estudio electroquímico

En base a las propiedades como electrodo que poseen Ti_4O_7 y Ti_5O_9 , se realiza un estudio electroquímico de la posibles reacciones redox que pudieran ocurrir entre éste y un medio que contenga radicales libres, en este caso $\text{DPPH}\cdot$, durante el proceso de neutralización. Este estudio se realizará mediante VC normal y de electrodo rotatorio, que permite estudiar mecanismos de reacción en relación con la química redox, y mediante ruido electroquímico.

6.3.1 Voltametría cíclica (VC)

En primer lugar se realizarán los estudios de VC con el electrodo estático, donde el electrodo de trabajo, según se ha indicado, es un disco de Ti_4O_7 , el contraelectrodo es una lámina de Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl , y el electrolito es una disolución 3 mM de $\text{DPPH}\cdot$ en Isopropanol. Durante el ensayo no se registra ninguna señal que indique que se haya producido reacción de oxidación o reducción alguna, como se puede observar en la **Fig. 7.4a**. Esto mismo se observa en el blanco realizado

usando los mismos electrodos, pero esta vez utilizando sólo Isopropanol como electrolito (**Fig. 6.4b**). Las únicas diferencias observadas son respecto a la intensidad de corriente registrada y la carga de la doble capa eléctrica formada, que son ligeramente superiores cuando están las especies radicales presentes.

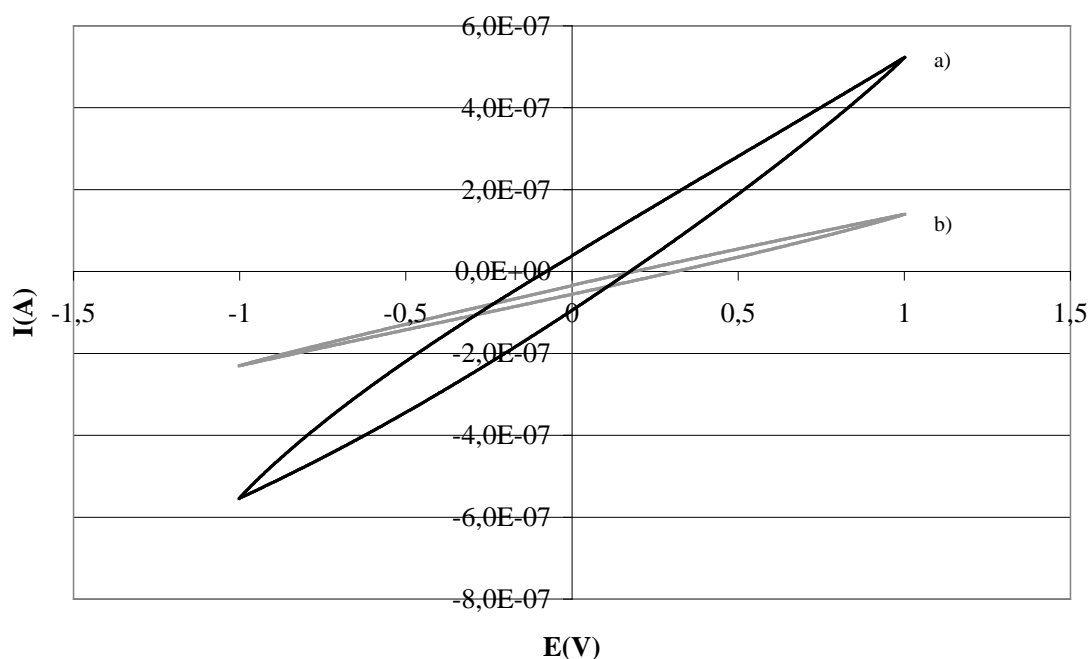


Fig. 6.4 VC de Ti_4O_7 denso usado como electrodo de trabajo, Pt como contraelectrodo, como electrodo de referencia Ag/AgCl y como electrolito a) una disolución de DPPH· 3mM en Isopropanol (gris), o b) Isopropanol (negro). Como contraelectrodo se usó Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl. La velocidad de barrido es de 20mV/s.

En el estudio de VC con electrodo rotatorio como electrodo de trabajo, el Ti_4O_7 en polvo se soporta mediante un adhesivo de carbono conductor. El resto de las condiciones son iguales al caso anterior. El voltamograma obtenido a 1000 rpm se muestra en la **Fig. 6.5** y en él se pueden observar dos reacciones. Por un lado, la reacción reversible de oxidación-reducción de DPPH· a DPPH_2 y viceversa que ocurre entre los 0,5 a 1 V respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl. Dichos valores pueden ser comparados con los hallados en la bibliografía respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl [4], y calomelanos y utilizando diferentes electrodos de trabajo como por ejemplo glaxi carbon [2, 3]. Además estos picos pueden ser también observados en los blancos hechos usando como electrodo de trabajo el mismo electrodo rotatorio con su superficie de platino, sin adhesivo de carbono (**Fig 6.6a**), y con el adhesivo de carbono

sin Ti_4O_7 (**Fig. 6.6b**). Además se puede afirmar que estos picos son debidos al $\text{DPPH}\cdot$ y no al isopropanol puesto que no aparecen en los blancos realizados con el electrodo rotatorio, con y sin adhesivo de carbono, con Isopropanol como electrolito (**Fig. 6.7**). Por otro lado, se observa un pico intenso de reducción que se debe a la lámina de carbono sobre la que es soportado nuestro material. Al igual que antes el material no muestra ningún cambio. En cualquier caso, ninguna de las señales observadas puede ser asignada a una reacción de oxidación o reducción en el material.

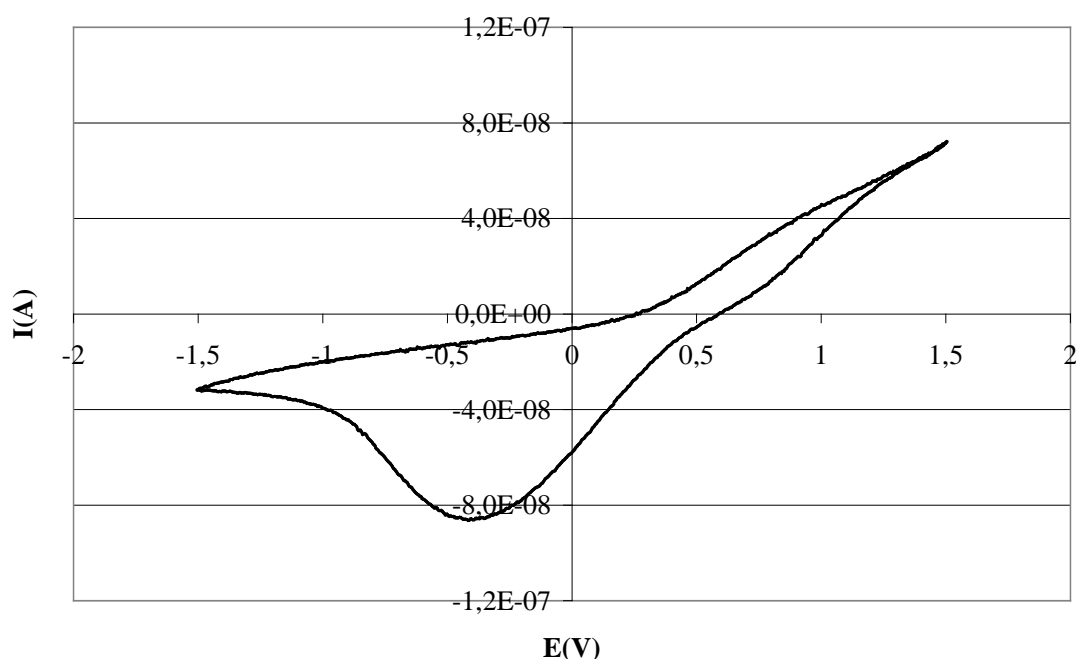


Fig. 6.5 VC con $\text{DPPH}\cdot$ 3mM como electrolito, usando como electrodo de trabajo Ti_4O_7 en polvo soportado mediante adhesivo de C al electrodo rotatorio. La velocidad de rotación del electrodo es de 1000 rpm. Como contraelectrodo Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl. La velocidad de barrido es de 20mV/s.

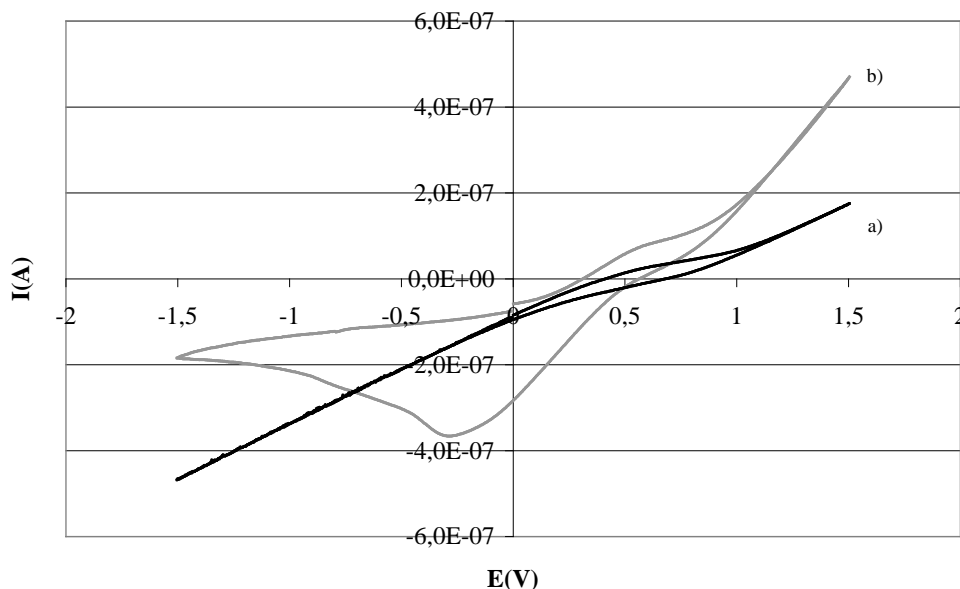


Fig. 6.6 VC en DPPH· 3mM como electrolito, usando como electrodo de trabajo un electrodo rotatorio de a) Pt (negro), o b) adhesivo de C sobre el Pt (gris). La velocidad de rotación del electrodo es de 1000rpm. Como contraelectrodo Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl. La velocidad de barrido es de 20mV/s.

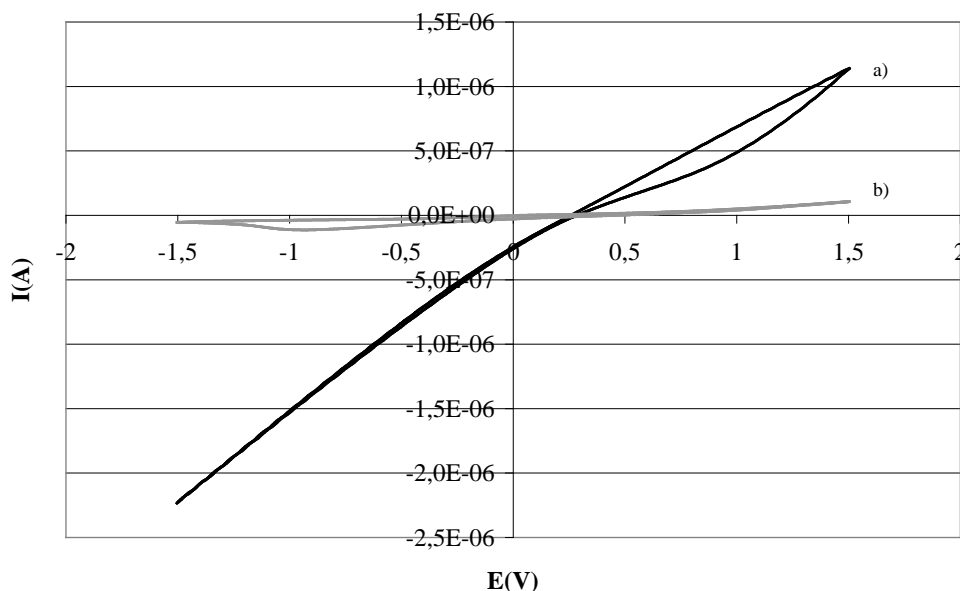


Fig. 6.7 VC con Isopropanol como electrolito, usando como electrodo de trabajo un electrodo rotatorio de a) Pt (negro) o b) adhesivo de C sobre Pt (gris). La velocidad de rotación del electrodo es de 1000rpm. Como contraelectrodo Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl. La velocidad de barrido es de 20mV/s.

El material por tanto, no muestra ninguna modificación importante en los ensayos. Esto concuerda con el hecho de que es un buen material para su uso como electrodo.

8.3.2 Ruido electroquímico (ECN)

Lo más importante de esta técnica es que permite registrar las posibles reacciones de oxidación-reducción que pudieran tener lugar, sin aplicar una señal de entrada que modifique las verdaderas condiciones de trabajo. En la **Fig. 6.8** se puede observar lo que ocurre cuando se añade DPPH· hasta una concentración 3mM en una celda donde se encuentran tres electrodos iguales de Ti_4O_7 (el de trabajo, el de referencia, y el que elimina el ruido que no pertenece a la celda) en medio Isopropanol. Inmediatamente se comienza a observar una reacción de reducción que durante los primeros 20 min da lugar a un intenso aumento de corriente y una disminución también intensa de potencial. Dicha reacción parece prolongarse durante las 10h siguientes, pero dando lugar a cambios de corriente y potencial más leves. La reacción registrada puede ser asignada a la reducción del DPPH· en la superficie del material. Por último, parece alcanzarse un equilibrio, quizá donde el material deja de neutralizar radicales. Por otro lado, se realiza el mismo ensayo pero usando tres electrodos iguales de Pt (**Fig 6.9**). En este caso al añadir el DPPH· se observa un cambio rápido de corriente y potencial, donde ambos aumentan y disminuyen rápidamente en un intervalo de tiempo de 5 min. A partir de aquí corriente y potencial aumentan y disminuyen respectivamente a la par, lo cual indica que no existe reacción alguna con el material

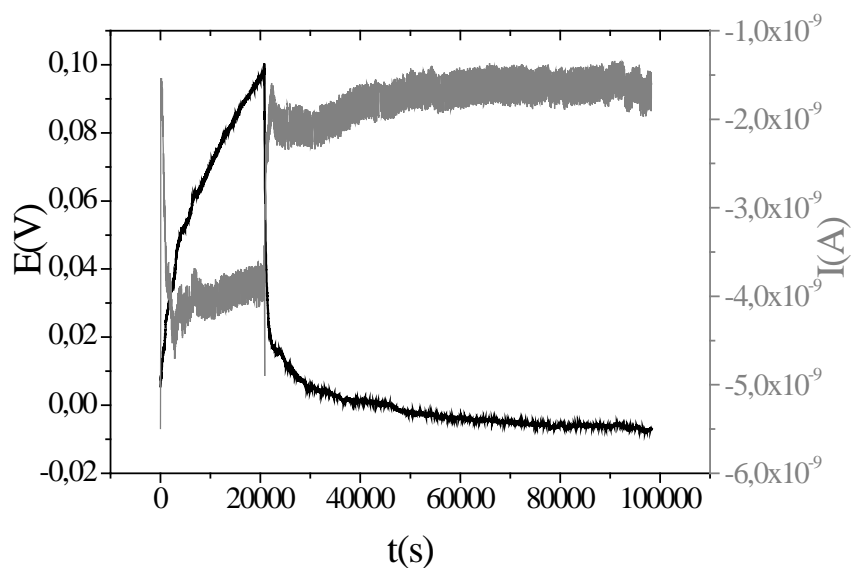


Fig. 6.8 ECN para una celda compuesta de tres electrodos de Ti_4O_7 en medio isopropanol. A los 20000 s se añade $\text{DPPH}\cdot$ hasta una concentración 3mM.

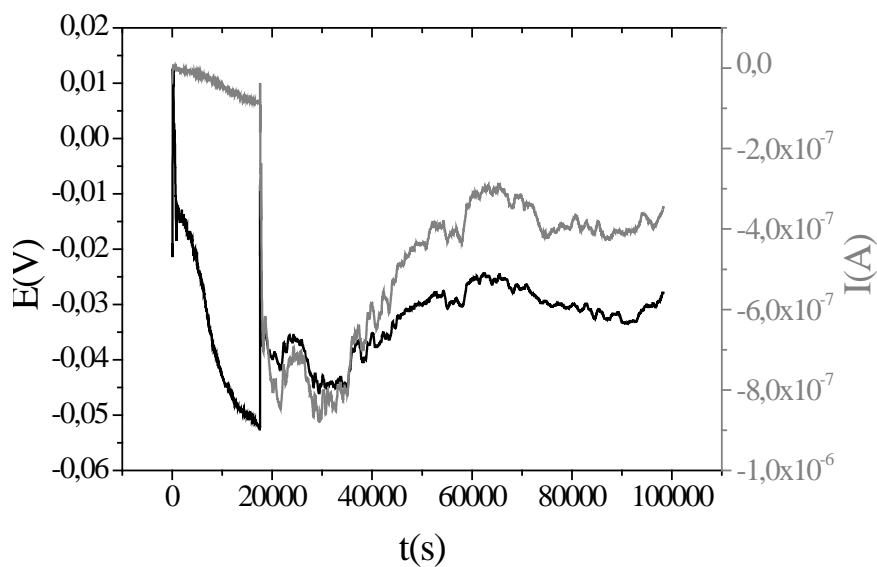


Fig. 6.9 ECN para una celda compuesta de tres electrodos de Pt en medio isopropanol. A los 20000 s se añade $\text{DPPH}\cdot$ hasta una concentración 3mM.

6.4 Conclusiones

Los diferentes ensayos realizados con materiales de TiO_2 Y Ti_5O_9 , en medio $\text{DPPH}\cdot$ para estudiar, los posibles cambios que tienen lugar en el material durante el mecanismo de reacción indican que:

- ❖ Respecto al medio de reacción, disolución de $\text{DPPH}\cdot$ 3mM, podemos afirmar que se reduce a DPPH_2 , mediante Absorbancia UV-Vis.
- ❖ Los materiales no muestra cambios de fase, reducciones u oxidaciones mediante DRX, ni se observan pasivaciones o cambios importantes que indiquen una oxidación mediante medidas de *Band Gap*.
- ❖ Los ensayos electroquímicos, haciendo uso del Ti_5O_9 como electrodo de trabajo muestran que el material no sufre ningún cambio durante el proceso de neutralización:
 - ✓ Mediante voltametría cíclica con electrodo rotatorio muestra: Que entre la superficie del electrodo y el medio se produce la reacción reversible $\text{DPPH}\cdot \leftrightarrow \text{DPPH}_2$, sin embargo, no se observan señales asociadas a reacciones redox al material.
 - ✓ Mediante ruido electroquímico, se observa una reducción progresiva con el tiempo que se asocia a la reducción de $\text{DPPH}\cdot$ a DPPH_2 en la superficie del electrodo. De nuevo no podemos asociar ninguna de las señales al material.

Bibliografía

1. Ionita, P., *Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species?* Chemical Papers, 2005. 59(1): p. 11-16.
2. Milardović, S., D. Iveković and B.S. Grabarić, *A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical.* Bioelectrochemistry, 2006. 68(2): p. 175-180.
3. Milardovic, S., D. Iveković, V. Rumenjak and B.S. Grabarić, *Use of DPPH•/DPPH redox couple for biamperometric determination of antioxidant activity.* Electroanalysis, 2005. 17(20): p. 1847-1853.
4. Zhuang, Q.K., F. Scholz and F. Pragst, *The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles.* Electrochemistry Communications, 1999. 1(9): p. 406-410.
5. Gomes, A., E. Fernandes, M.B.Q. Garcia, A.M.S. Silva, D.C.G.A. Pinto, C.M.M. Santos, J.A.S. Cavaleiro and J.L.F.C. Lima, *Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones: Relationship with the antioxidant activity.* Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2008. 16(17): p. 7939-7943.
6. Kohen, R. and A. Nyska, *Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification.* Toxicologic Pathology, 2002. 30(6): p. 620-650.
7. Pisoschi, A.M., M.C. Cheregi and A.F. Danet, *Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: Electrochemical and spectrophotometrical approaches.* Molecules, 2009. 14(1): p. 480-493.
8. Doherty, P.E., M.J. Psaila-Dombrowski, S.L. Harper and W.G. Schneider, *The use of electrochemical noise measurement in the evaluation of materials for steam generators.* ASTM Special Technical Publication, 1996. 1277: p. 288-304.
9. Rosero-Navarro, N.C., M. Curioni, R. Bingham, A. Durán, M. Aparicio, R.A. Cottis and G.E. Thompson, *Electrochemical techniques for practical evaluation of corrosion inhibitor effectiveness. Performance of cerium nitrate as corrosion inhibitor for AA2024T3 alloy.* Corrosion Science, 2010. 52(10): p. 3356-3366.
10. Robert Cottis, S.T., *Electrochemical Impedance and Noise.* 1999.
11. Molyneux, P., *The use a stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for stimating antioxidant activity.* Songklanakarin J. Sci. Technol, 2004. 26: p. 211-219.

Capítulo VII

VII Evaluation of electrical stimulation of neural growth in Direct Current by using Electric Field

7.1 Introduction

In chapter I it was showed how chemical, physical and electrical gradients inside and outside cells interact, and how the responses to these reactions are read and translated in fundamental cellular processes [1]. According with the idea of the epithelial wound repair model [1, 2], the growth direction of cells is not arbitrary when electric field (EF) is responsible of its orientation.

Many neurobiologists report the existence of direct-current (DC) electric fields (EFs) in the central nervous system (CNS, and bet on the use of DC EFs in the nervous system development and regeneration [3]. Some works showed that steady electrical signals are a natural consequence of spinal-cord transection in larval lampreys, and that an applied EF able to offsets these injury-induced signals, improves regeneration [4, 5]. The problem is that adult mammalian spinal cord axons do not present normally

regeneration. However, experiments *in vivo* carried out with DC EFs, on mammalian animals, show promising results. Some examples are summarized below. 300-400 $\mu\text{V}/\text{mm}$ EF applied by electrodes placed next to the spinal cord of guinea pigs recovers reflex in the 25% of the animals [6]. The same authors place the cathode, inside of a silicone tube, in the lumen of the spinal cord and, in this case axonal growth was stimulated [7, 8]. Moreover, in the first experimental phase with humans, electrical implants were tolerated during three months by patients, and one year after the removal of the implant nine of ten patients recovered sensorial function (no motor) [9].

Also, DC EFs can affect axonal growth apart from gradients of morphogens and growth factors. The model suggested for cathodal orientation of growth cones in *Xenopus* cells, explains that membrane receptors accumulate preferentially toward the cathode-facing side of the growth cone on cell bodies of EF-treated neurons. Neurotransmitter Acetylcholine (ACh) is spontaneously released by ACh receptors (AChR). Because AChRs accumulate cathodally on cell bodies of EF-treated neurons, growth cones turn toward to the cathode looking for a source of ACh. In this way, ACh-induced stimulation of asymmetrically distributed AChRs activates signaling cascades preferentially on the cathode-facing side of the growth cone relative to the anode-facing side. In the other hand, intracellularly there are signaling cascades implicated in EF-induced cathodal turning. Cathodal turning requires influx of Ca^{2+} via voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCC) and Ca^{2+} release from ryanodine and thapsigargin-sensitive intracellular stores. Activation of AChRs by spontaneous release of ACh, induces cytoplasmic Ca^{2+} elevation, since the receptors are “leaky” to Ca^{2+} . Activation of the neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3 and 2 (trkC and trkB respectively) receptors are also required for cathodal turning. Addition of Neurotrophin-3 NT-3, the ligand for the trkC receptor or brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the ligand for the trkB receptor, to the culture medium enhances the cathodal response. NT-3 and BDNF stimulate release of ACh from the growth cone enhancing the asymmetric signaling via AChRs at the cathodal side of the growth cone. trkB receptors and AChRs, activate the phospholipase C (PLC), phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) pathway, increasing intracellular Ca^{2+} even more. Ca^{2+} increase stimulates cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production via adenylate cyclase. At the same time, cAMP activates the protein kinase C-dependent (PKA), which affects signaling by the Ras

homolog gene family (rho), family of small enzymes guanosine triphosphatases (GTPases), for example: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rac1), Ras homolog gene family, member A (rhoA) and cell division control protein 42 homolog (cdc42). Activation of rac1 and cdc42 by PKA stimulate lamellipodial and filopodial formation, respectively. According with that, EF-stimulated orientation of filopodia and lamellipodia on the cathode-facing sides of growth cones and it is essential for cathodal orientation. In the opposite side, inhibition of rhoA by PKA activation prevents cathodal growth cone collapse, but relatively low levels of PKA signaling anodally permit rho mediated growth cone collapse enhancing growth cone asymmetry. This leads to an asymmetric tension within the growth cone and the turning toward the cathode. Therefore, Ca^{2+} elevation is the centre of the proposed mechanism. Using fluorescence imaging, there is direct evidence that Ca^{2+} concentration in the growth cone increases upon exposure to an EF of 150 mV/mm [2] (**Fig. 7.1**).

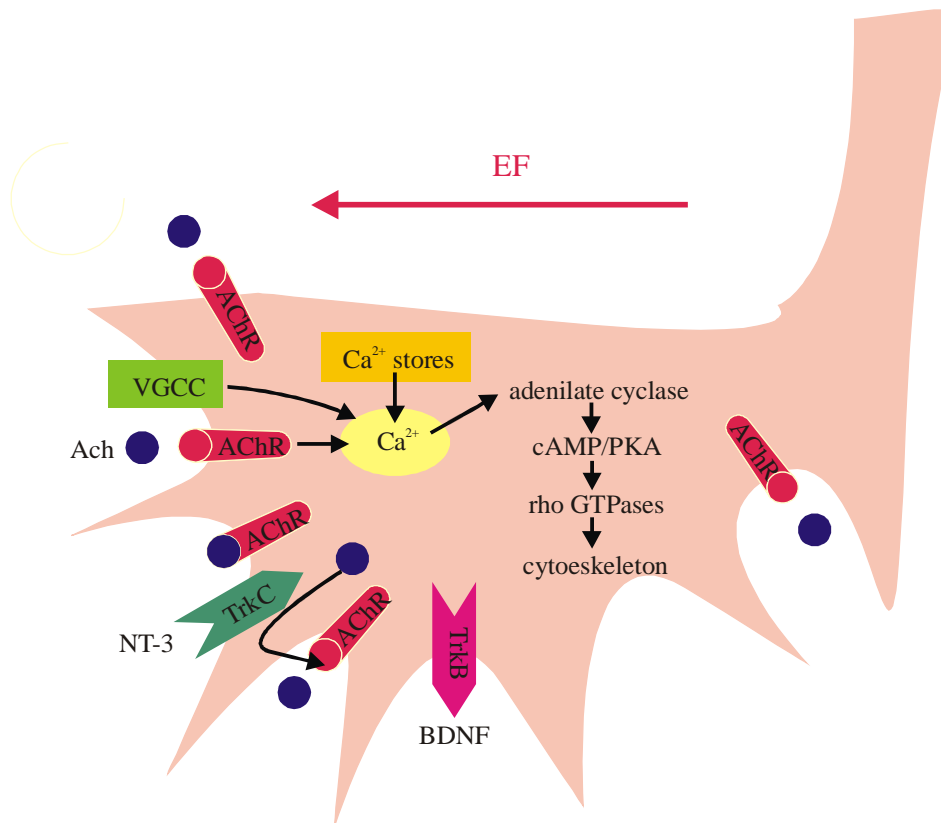


Fig. 7.1 Axonal growth affected by EF.

The substrate has an important influence over the cell response. On one hand, what is the influence of the surface topography where the cells are plated? The studies about the influence of the microtopography, mostly made in 1980s and 1990s, are the origin in the recent studies about the influence of nanotopography on the cell behaviour. Many cellular components are in the nanometric size (actin fibres, myosin filaments, proteins embedded in the plasma membrane, attachment points of the cells, etc...). Thus, it seems likely that cells would possess mechanisms for interacting with nanometric features of the surrounding environment. The smaller nanoparticles would have insufficiently large electrostatic forces of repulsion to prevent Brownian motion bringing them into contact with almost any surface, so that cells would be constantly experiencing encounters with these small particles. Some of the properties which have been studied according with influence of the nanotopography are: cell adhesion, cell activation, cell movement, morphology, neurite shape, cell shape, proliferation, cytoskeletal changes, apoptosis, endocytosis osteogenesis and tissue rebuilding [10]. On other hand, what is the influence of the surface chemistry in the cell responses? Many studies have been focused on identifying the type, conformation and density of adsorbed protein layer that dictates the cell adhesion. For example, adsorption of the cell adhesion protein, fibronectin, on different surfaces alters protein structure and modulates such alterations in cell adhesion, spreading and migration. The supramolecular structure of adsorbed proteins plays a role in the specific substrate-protein-cell interactions that control cell responses to surface chemistry. Furthermore, in orthopaedics and dental application metal surfaces are used. In that case, the oxide film created on metal surface is responsible for the attachment. Hydroxyl groups in the surface provide locations for bonding using silane chemistry [11].

Cell-substrate adhesion is related closely to surface charge. About 90% of the surfaces charges are negative at physiological pH, a strong electrostatic attraction exists between cells and positively charged substrates, such as polylysine. This one is commonly used as adsorbed protein layer which improves cell-substrate adhesion. However, other surfaces used in neural cell culture like Falcon plastic, without any adsorbed protein or laminin as adsorbed protein layer, have a negative net surface charge. It has been proved net surface charge of the material has a contribution in the direction of neurite growth in a weak DC EF. While Falcon or laminin induce cathodal

galvanotropism, polylysine induces anodal galvanotropism. It was carried out by Rajnicek et al [12] and they suggest in the work two possible mechanisms: (a) Increased electrostatic attraction of the anodal or cathodal side of the growth cone leads to turning. Positive membrane proteins accumulate cathodally and negative membrane proteins accumulate anodally. On negatively charged substrata, such as laminin or Falcon, growth cones may adhere more strongly cathodally and on positively charged substrata, such as polylysine, growth cones may adhere more strongly anodally via electrostatic attraction. (b) Interaction of several electric field effects may produce substrate-dependent galvanotropism. Regardless of substrate type, the cathode-facing regions of the growth cone experience increased calcium influx via field-induced membrane depolarization or accumulation and activation of membrane proteins such as calcium channels or acetylcholine receptors. While the role of calcium in galvanotropism is controversial [13, 14], increased calcium in the cathode-facing side of the growth cone could stimulate cytoskeletal dynamics and membrane addition cathodally. Substratum-bound polylysine stimulates substratum adhesion, localized actin polymerization [15], and anodal turning. Therefore lamellipodial stability, filopodial stability, and substratum adhesion may be enhanced anodally on polylysine. Anodal turning would result if these effects predominated over cathode-directing events.

According with the theory summarized previously as introduction of this chapter and in the general introduction of the thesis, the aim of this section is evaluate the morphology of *Xenopus* cells cultured over the substrate suggested, TiO₂, and the influence in these cell cultures when EF in DC is applied by Ag electrodes trough Agar bridges. Always, the assays will be compared with a control using *Xenopus* cells cultured over a cover glass substrate. On other hand, it will be evaluated the influence on *Xenopus* cells cultured over *cover glass*, when EF in DC is applied by prepared Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes. In this case, an EF in DC applied by Ag electrodes, trough Agar bridges, to *Xenopus* cells cultured over *cover glass* will be used as control.

This study was carried out during a two short stays in the Institute of Medical Sciences from Aberdeen University (Scotland), under the supervision of the Dr. Ann Rajnicek.

7.2 Assays preparation

7.2.1 Cell Culture

Primary cultures of neural tube cells were prepared from stage 20 *Xenopus* neural tubes [16] according to the method of Hinkle *et al.* (1981) [17], with minor alterations. Specifically, we aimed to minimize chamber-to-chamber variability by pooling all neural tubes for one experiment in the Ca^{2+} – Mg^{2+} -free Steinberg's solution (disaggregating medium). Disaggregating medium was then replaced with an appropriate volume of culture medium (200 μl per chamber) and the resulting cell suspension was triturated with a Rainin RC 20 pipet tip. Culture medium consisted of (v/v) 20% Leibowitz L15 medium, 2% penicillin (5000 IU/ml)/streptomycin (5000 mg/ml), 1% fetal bovine serum (all from ICN Biomedicals) made up in Steinberg's solution (58 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.44 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.3 mM MgSO_4 , 4.6 mM Tris–HCl, pH 7.9).

For cell cultures over *cover glass* the cells suspended in culture medium were plated into the trough defined by the parallel cover glass strips, then a third *cover slip* (22 x 22 mm) was secured on top using a non-curing silicone compound (Dow Corning MS4). Before starting to apply EF is necessary to wait a certain culture time (1h after plating); afterwards, most cells had adhered to the dish surface but had not yet sprouted neurites at the time of field initiation.

In the case of cell cultures over TiO_2 , cells suspended in culture medium were plated over surface sample and coat with a cover slip (22 x 22 mm) in the top. After the culture time (1h after plating) the *cover slip* was removed by floating in medium culture. The TiO_2 cultured face was placed into the trough defined by the parallel *cover glass* strips that were used as support and positioned towards the bottom of the chamber. Culture medium was added by filling the gap between the cultured surface of the sample and the bottom of the chamber

7.2.2 Electric Field Application

The basic requirements for the application of EFs to cells *in vitro* have been previously described [18]. The base of the chamber was around 100-mm-diameter, 20-mm-high tissue culture plastic dish to which two 12 x 64-mm strips of No. 1 cover glass were secured parallel to each other, 1cm apart with silicone sealant (Dow Corning 3140RTV). Chambers were allowed to cure for at least 24h and were then used immediately for experiments or were treated with an appropriate substrate molecule.

The electrical contact with the culture chambers were made using two 20-cm-long U-shaped tubes filled with Steinberg's solution gelled with 1% agar. One end of each bridge rested in a saline-filled beaker which, in turn, contained an Ag/AgCl coil electrode connected to a DC constant current source. The other end of each bridge terminated in a pool of culture medium continuous with that in the central trough containing the cells. Electrical field applied is 150 mV/mm of sample length during 3 hours (**Fig. 7.2**). This EF was optimized for cell cultures over cover glass and used for cell cultures over TiO₂.

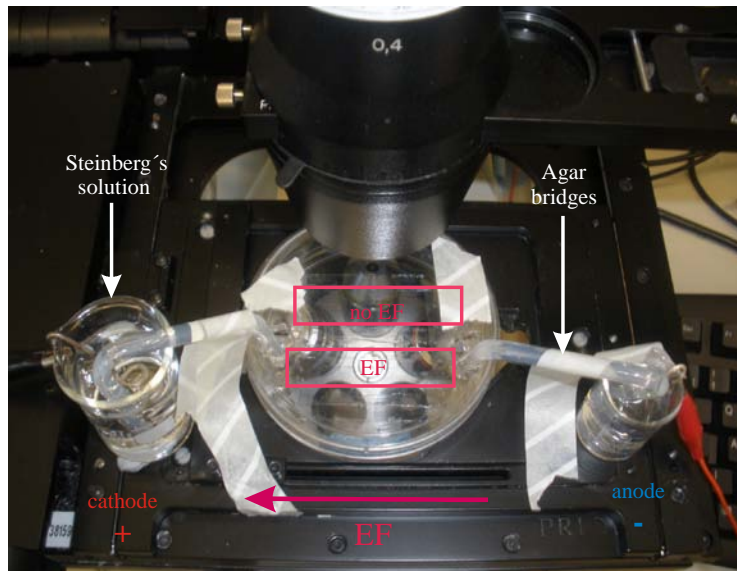


Fig. 7.2 Setup of DC EF in *Xenopus* cell cultures over cover glass assays. Observation of cell cultures is carried out with a phase contrast microscope. EF is applied with Ag electrodes in a Steinberg's solution connected with the cell culture through agar bridges.

Synthesised and then *calcined* Titania powders were pressed isostatically to prepare a compact, which was further sintered in air at 1400°C for 4 hours. Discs are obtained from this dense compact by microcutting and undergo a final reduction treatment in H₂/N₂ (90:10) at 1400°C for 12h.

These Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes were designed as shown in **Fig. 7.3** with the Ti₄O₇/Ti₅O₉ pellet placed at the end of a polymeric tube and contacted with a Cu wire by means of silver paste. A polymeric material surrounding the pellet was used to seal the system. The total lack of media inside the electrode was checked and ensured in addition, silver diffusion through the Ti₄O₇/Ti₅O₉ pellet was not detected. The fabrication of the electrodes was explained in Chapter III about Materials and Methods and the characterization of the Ti₄O₇/Ti₅O₉ pellet was illustrated in Chapter VI about Material for electrodes in biomedicine.

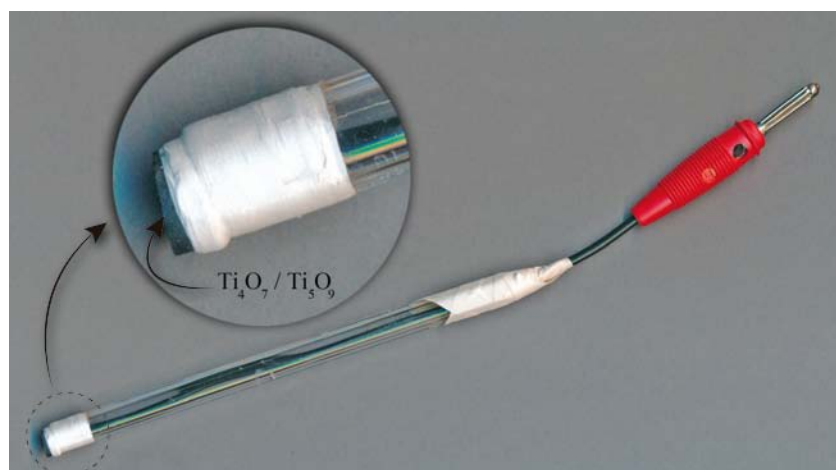


Fig. 7.3 Setup of an electrode of Ti₄O₇/Ti₅O₉

When EF is applied through Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes, both are placed straight to the medium. In that assay it was desired that electrodes should not be placed on Steinberg's solution connected with the cell culture through agar bridges, to study their interaction with the tissue in a more feasible application. With these electrodes medium reactions are avoided in the potential window used, so preliminarily, the use of Agar Bridges and the Steinberg's solution are not required. Working electrodes connected to the power source will be placed in opposite ends of the cover glass. The right electrode

will work as anode and left one as cathode (**Fig. 7.4**). Will be show in the results that 10 and 15 mV/mm of EF will be applied in these assays.

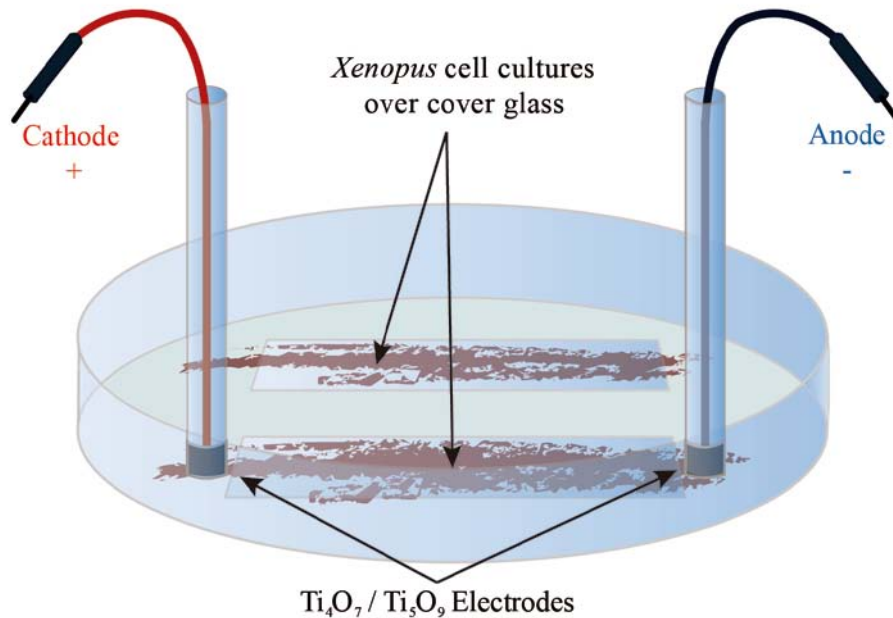


Fig. 7.4 Setup for DC EF stimulation of *Xenopus* cell cultures cultured over cover glass.

Observation of cell cultures is carried out with a phase contrast microscope. EF is applied through Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes.

7.2.3 Data Collection and Analysis

7.2.3.1 Phase-contrast microscope

Data of neural cells growth over *cover glass* were collected as photographs on Axiovert 25 Zeiss phase-contrast microscope. A mapping of the substrates was made and all cells in each chamber whose neurite paths could be identified unambiguously were photographed for analysis at 0, 1, 2 and 3 hours. The length and angle turned was measured for every neurite, of each neural cell at different times. A statistical study was made with the angles turned with the aim of knowing the percentages of neurites that turned on towards the cathode, the anode or that did not turn at all, and also the final direction that they faced. Only neurites whose angle turned is higher than 15° were considered that turned on. For angle turned measurements, the turn direction and the final direction facing was determined using the plane showed in **Fig. 7.5**. Where, -90°

indicates cathodal direction, 90° indicates anodal direction and 0° is the perpendicular direction of EF.

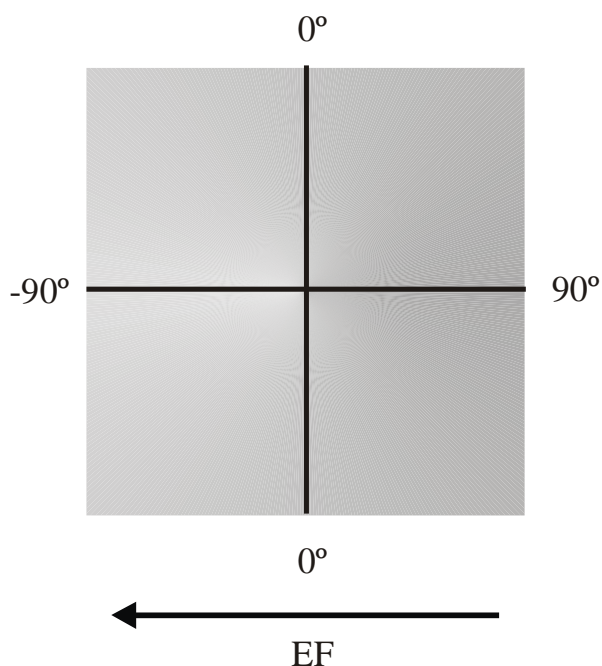


Fig. 7.5 Angles distribution plane used for the angle turned measurements in cell cultures when EF is applied.

7.2.3.2 Fluorescence microscope

Due to the physical properties of TiO_2 the protocol to study cell cultures evolution over the substrate when an electric field is applied was change. In this case, a culture of cells over *cover glass* was used as control and was subjected to the same methodology that the cultures onto TiO_2 substrates. After 3 hours of experiment, the cultured cells over *cover glass* (different from the last test) and TiO_2 , in both cases, when EF is and is not applied, were fixed with a solution 4% Formaldehyde in Phosphate Buffer Solition (1 tablet Sigma in 200 ml of MILI-Q water) and 0.1% Tween-20 (PBST). The stain was carried out with Rhodamine Phalloidine. The cultured face was coated with a *cover glass* and Vectashield was added to prevent the photobleaching.

All cells in each chamber whose neurite paths could be identified unambiguously were photographed for analysis. Photographs were taken on

fluorescence microscope Axio Cam MRm from ZEISS. The photographs of neural cells over *cover glass* and TiO₂ substrata, before and after EF application, were compared. Moreover, the directional responses in all cases were expressed qualitatively by superimposing the neuronal cell bodies onto a tracing of the neurite paths at the end of the experiment, obtained representations are called “spider diagrams”, and allows a clear qualitative identification of the direction on neurite development.

7.3 Influence of the substratum in the Neuronal morphology

With the aim of studying the influence of substratum in the neural cells morphology, it was carried out the observation of *Xenopus* cell cultures over different substrates. The fluorescence images of neural cells cultured over TiO₂ substrate show wider lamellipodia and an increase in the number of filopodia when they are compared with those cells grown over the cover glass slides and glass slides of borosilicate (microscope supports), which are used as control (**Fig. 7.6**). It is clear that cells present different behaviour over different substrates. The properties of the surface, where the material take contact with cell through the cell-material interface, will be responsible for the cell response. Morphology, composition and charge of the surfaces are related with the morphology and adhesion of the neurons cultured over the material [10, 11, 19].

These differences detected were quantified measuring and comparing the lengths of the axons, the number of branches, the number of filopodia in the growth cone and the density of filopodia in the axons (number of filopodia in the axon/length of the axon) (**Table 7.1**). Averages for number of branch, filopodia in the growth cone and density of filopodia in the axon in neural cells cultured over TiO₂ substrates, (0.351, 4.645 and 0.063, respectively), are the highest in comparison with the other materials, used as control. For example, in cover glass these averages are 0.379, 5.634 and 0.098, respectively. However, the length of the axons (54.069 μm) in this material (TiO₂) is shorter than in the *cover glass* (72.591 μm), but higher than axons for those cells cultured into glass (50.514 μm). When EF is applied in the cell cultures over TiO₂, all values (length of the axons, the number of branches, the number of filopodia in the growth cone and the density of filopodia in the axons) decrease respect to the values obtained when no EF is applied in cell cultures over the same substrate. Nevertheless, and despite of lower values, cells showed a high number of branch and a high density of

filopodia in their axons (0.360 μm and 0.078 μm , respectively) compared with values for both controls. In the opposite side, the number of filopodia in the growth cone and length of the axons (3.740 and 48.933 μm , respectively) are lower than values for the controls. Finally, it is clear that in EF conditions, cells continue showing a healthy growth over the substrate (TiO_2), characterized by elevated values of branch and filopodia density in the axon, listed in Table 8.1. Nevertheless, shortest length of the axons means that the cells are growing slower, possibly due to a slower filopodia growth in the growth cone, related with the EF stimulation.

Xenopus cell cultures over TiO_2 substrates show wider lamellipodia and numerous filopodia than *Xenopus* cells cultured over *cover glass* and glass, this suggests that TiO_2 is a good substrate for neural cells culture, because provide a surface with physical and chemical properties positives for *Xenopus* cells, and confirms the high biocompatibility of this material. Moreover, the wider lamellipodia values and the high concentration of filopodia in the axons and growth cones are indicative of the good adhesion between the cells and the ceramic substrate. Every filopodia created increases the possibility of branch formation, and the high number of branches gives rise to an elevated number of neuron-neuron connections. The lower value measured for axon length average, can be explained according with the biological processes responsible of the formation of filopodia and branch. It is assumed that the full energy that the cells possess to growth is divided among all the process involved in that growth like fillipodia development, branches formation and axon growth. Therefore, the differences among the values obtained to each material indicate in which of the different process (increase the length of the axon, or the number of branches or filopodia) the cell employs the higher percentage of the energy dedicated to grow; and those, as it is shown from the values in the **Table 7.1**, are distinct from each material.

In general, cells show a healthy and developed morphology over TiO_2 substrates with a well extended soma and no indication of cell aggregation.

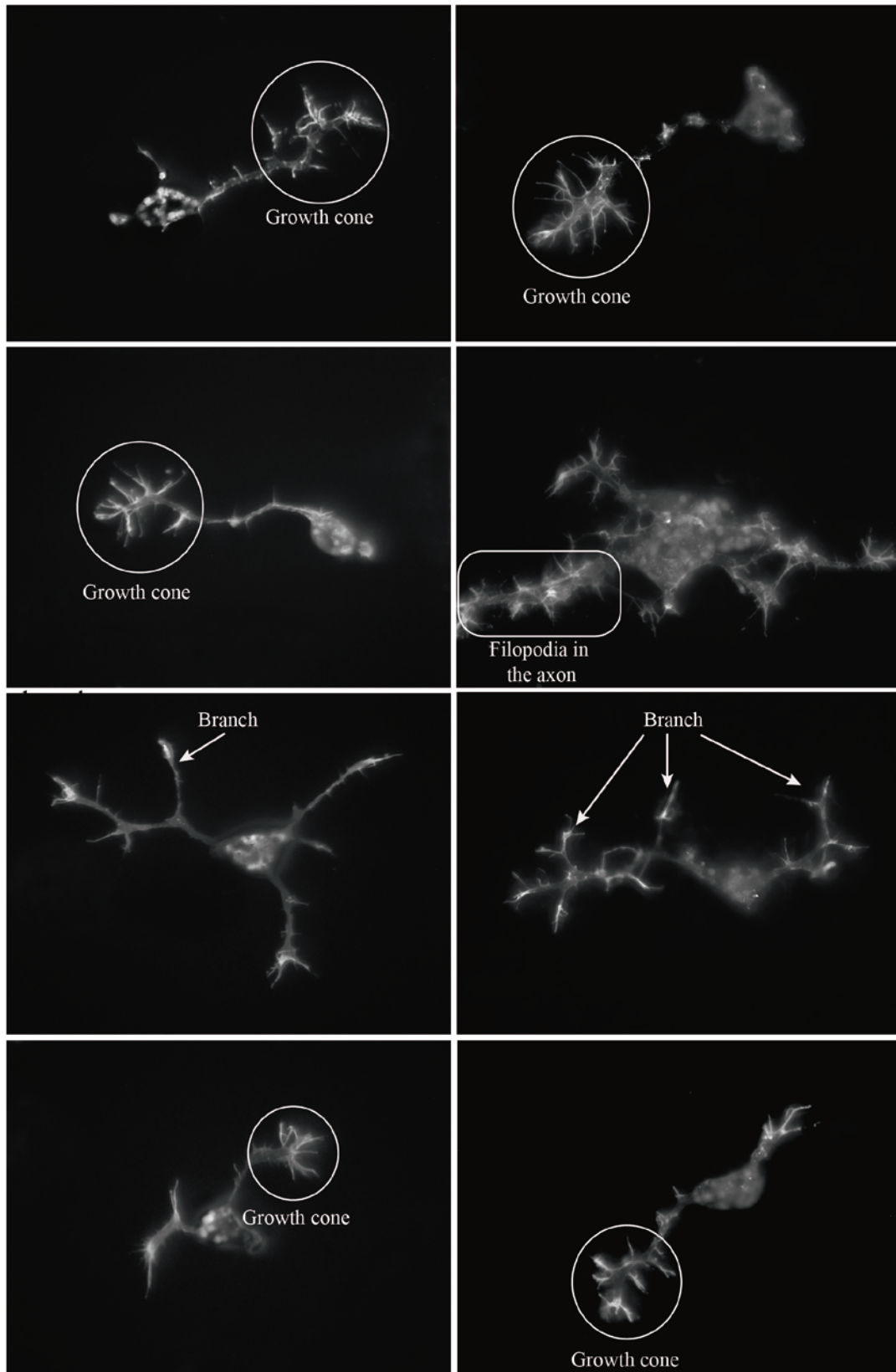


Fig 7.6 Fluorescence microscope photographs of *Xenopus* cell cultures over *cover glass* substrate (left column) and TiO₂ substrate (right column). Wider lamellipodia and numerous filopodia are observed for TiO₂ substrate.

Table 7.1 Averages of: the length of the axons, the number of branches in the axons, the number of filopodia in the growth cone and the number of filopodia in the axon per μm , in cells cultured over different control substrates and in TiO_2 substrata, when EF is and is not applied.

	Length of the axons (μm)	No. of Branches	No. Filopodia growth cone	Density Filopodia in the axon (No. filipodia/ μm^{-1})
TiO_2	54.069	0.379	5.634	0.098
TiO_2 EF 150 mV/mm	48.933	0.360	3.740	0.078
Cover glass	72.591	0.351	4.645	0.063
Glass	50.514	0.197	5.265	0.052

Some of TiO_2 surface properties are related with the behaviour of the cells when they are cultured over it. For example, chemical and morphological properties of TiO_2 surfaces are responsible for the surface energy of the material in contact with a watery medium. Lower contact angles (between material and medium) mean lower surface energy and according with it, a better wetting of the surfaces by the liquid medium. If the surface of the material has a good contact with the cell culture medium this allows an easier adhesion of cells onto the surface of the substrate. In the surface of TiO_2 substrates prepared, the contact angle is 34° (**Fig. 3.25**). It is a low angle that means a properly interaction with the medium.

On other hand, when the TiO_2 surface layer is in contact with a watery medium similar to biological, different processes take place in the oxide-liquid interface. First one is the hydration of the oxide where hydroxides are formed in the surface. Second one is the acidic-base reactions suffered by the OH groups which make possible the existence of electric charges in the interface. At pH 7 OH groups, which are linked to acidic points, lose protons lightly, creating a superficial charge. That is responsible for the electrostatic surface interaction with inorganic ions and macromolecules like proteins, lipids and polysaccharides which are present in the cellular membrane; or even

Ca^{2+} ions that could explain the high amount of filopodia developed for the *Xenopus* cell cultured on TiO_2 .

Finally, the surface of TiO_2 pellet sinterized in two thermal treatments to $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$, which was studied in Chapter IV, shows the next properties by SEM: high density (confirmed in 98% with a density measurement by Arquímedes method); low porosity; and the existence of two different kinds of areas in the surface, big grains areas and high density of grain borders areas (**Fig. 3.28**). In **Fig. 3.21** was discussed how high density of grain border improve the morphology of the cells, regarding to the number of neuritis, which grow over the surface of TiO_2 . However cell get adhere, survive and sprout over a grain border and over a grain surface (**Fig. 3.22**). The nanometric topography of the surface is other important parameter in the behaviour of the cells growth. In TiO_2 samples were found terraces (**Fig. 3.27 y 3.29**), placed close to the border grains, and the roughness (**Fig. 3.30**), that can be observed in the grain surfaces. This is confirmed because the assays of neurons culture realized on TiO_2 pellets polished and unpolished showed these cells adhered and growth healthy only on unpolished surface.

7.4 Field-Induced asymmetry of the direction of neurite growth

The influence of DC EF on the cone guidance growth has been widely studied for some author like *C. Mc Caig* and *A. Rajnicek*. A physiological EF, as low as 10 mV mm^{-1} (0.5 mV across a growth cone spanning $50\text{ }\mu\text{m}$), causes growth cones turn usually towards the cathode (video footage <http://www.abdn.ac.uk/~bms024/growthcone>). In the introduction of this chapter has been indicated the important role played by the surface of the substrate in the guidance of the cell growth. The synergistic relationship of surface charge and external EF applied establishes the growth cone direction as someone authors have proven [12].

Neuronal architecture is based on branches that are sculpted and directed by EF [20]. It is clear an EF and chemical gradient work together in growth cone guidance like they make in several vital functions and growth cones use common signalling pathways to respond to chemotropic cues and to EFs. Pharmacological experiments have shown how cathode attraction of *Xenopus* growth cones is a process which involves the

neurotrophin receptors trkB and trkC, the neuronal nicotinic ACh receptor (nAChR), receptor tyrosine kinases, phospholipase C, several isoforms of protein kinase C, extracellular Ca^{2+} , and Ca^{2+} from intracellular stores [14, 21-23]. EFs redistribute charged receptor proteins such as the epidermal growth factor (EGF) receptor [24, 25] and nAChR to the cathodal sides of cells. Whether this creates a gradient of activated receptors across the span of a growth cone is not known, but nAChR activity is essential for migration of growth cones towards the cathode [22].

The growth direction of the growth cones is influenced by the presence of EF. Growth cones turn towards the cathode pointing out the paths that will be followed by axons. The axon paths redirected try to be parallels respect to the EF direction (**Fig. 7.7**). Evaluation of the angles turned is carried out by two different methods according with the nature of the materials.

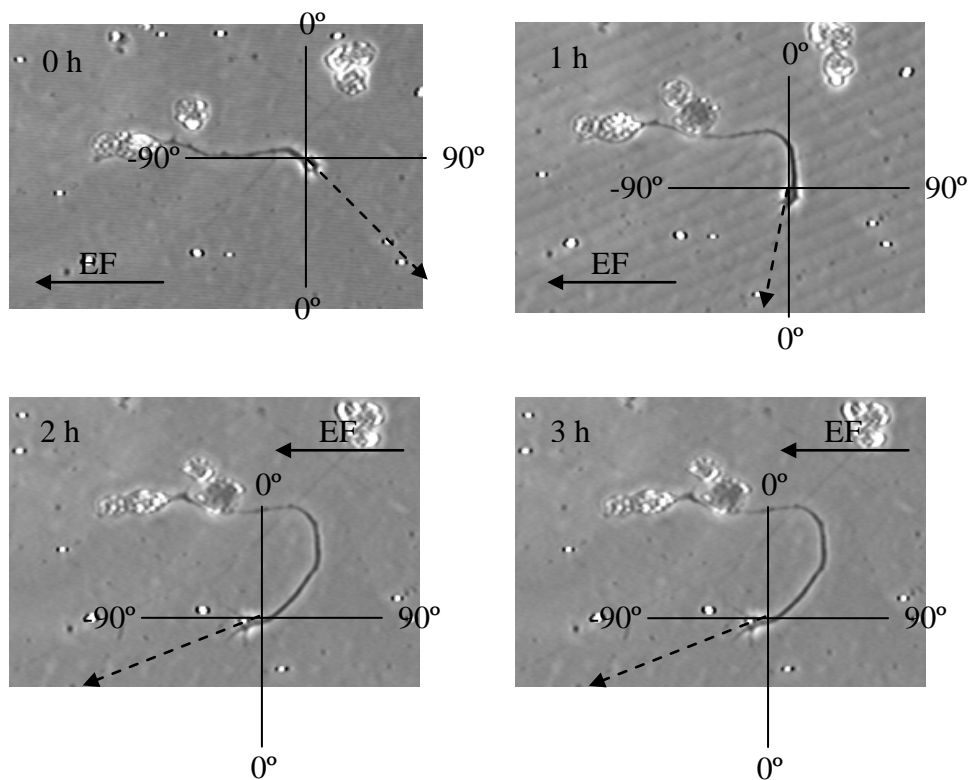


Fig. 7.7 Neuron cell growth pathway over *cover glass* substrate when EF is applied. 150mV/mm are applied during 3 hours and pictures taken at 0 hours, 1 hour, 2hours and 3 hours. The growth cone is oriented by EF and the axon turn towards the cathode.

7.4.1 Phase-contrast microscope for cover glass substrates

The angles turned by the growth cone over the plane described in **Fig. 7.5** were measured and the average calculated after 1, 2 and 3h under EF (150 mV/mm) stimulation and without EF (as control). **Fig. 7.7** shows the influence of EF in the neurites growth direction. The average of angle turned when EF is not applied in the cell culture is lower than when EF is applied, and closer to 0° (**Fig.7.8**). Neurites do not have a priority direction growth in this case, and angles turned measured, in case of neuritis turn towards the cathode and towards the anode are compensated. However, the average of angle turned is almost -20° at 2 hours when EF is applied (**Fig. 7.8**). This means neurites turn following a priority direction. The turn towards negative angles means that growth cones turned on cathodal. On other hand, when no EF is applied, besides average of angle turned is close to 0°, it decreases slowly with the time and can be consider unchanged. However, when EF is applied this average undergoes a high increase at two hours and a fast decrease at three hours. In both cases were observed that the growth rate stay stable with the time. Measured growth rates are between 20 and 25 µm/h. For this reason, the high increase of the average in the angle turned at two hours just can be explained according with EF application effect. And, the fast decrease at three hours could be explained by a decrease of the effectiveness of EF with the time above a determined time, which in this case seems to be around 2h.

When EF was applied (150 mV/mm), 40% of the neurites cultured on the cover glass turn towards the cathode while only 20% turn towards the anode. In both cases the turns of the neurites were higher than 15° after 3 hours (**Fig. 7.9**). After 3 hours 44% of neurites were orientated towards the cathode but only 17% were oriented towards the anode. It was also found after 3 hours, 39% of neurites were oriented perpendicular to the EF.

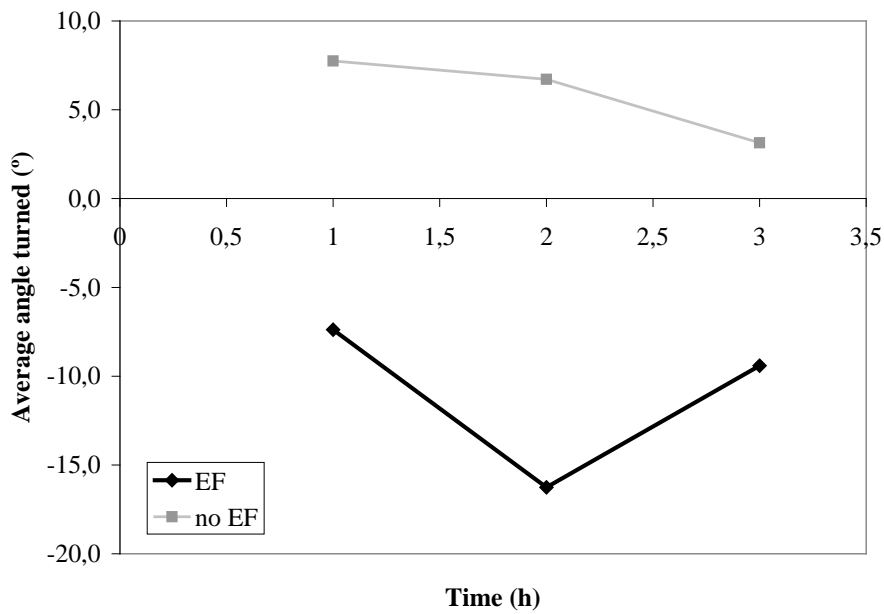


Fig. 7.8 Averaged angle turned at 1, 2 and 3 hours when EF is applied (black line) and without EF (grey line). When EF is applied averages are negatives, this means that neurites prefer cathode direction. But when EF is not applied, the average of angle turned is close to 0. This means that there is not a preference direction.

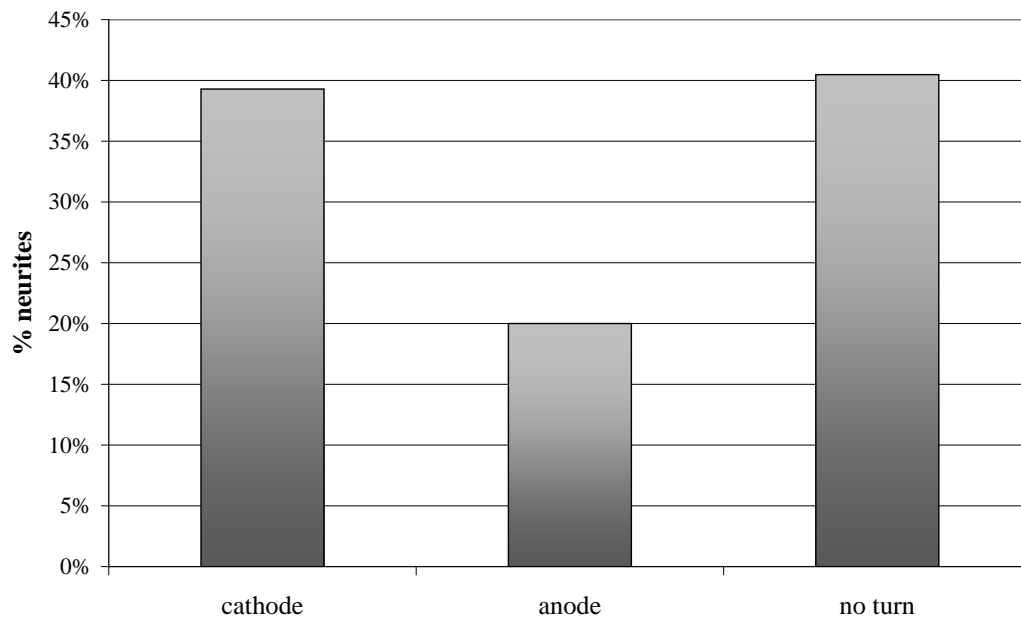


Fig. 7.9 Percentages of neurites of *Xenopus* cell cultured over cover glass substrate that turn towards the cathode, the anode or do not turn on, after 3 hours of EF (150 mV/mm) application. Only neurites that turned on more than 15° are considered.

If the percentages of neurites oriented to the cathode, anode or perpendicular direction, before and after the EF supply are compared, then is observed that the number of neurites oriented towards the anode decrease to increase the number of neurites oriented towards the cathode and the perpendicular direction with EF application (**Fig. 7.10**). In general, according with the assays carried out can be asserted that *Xenopus* cell cultures over *cover glass* show a priority growth direction towards the cathode when an EF of 150 mV/mm is applied.

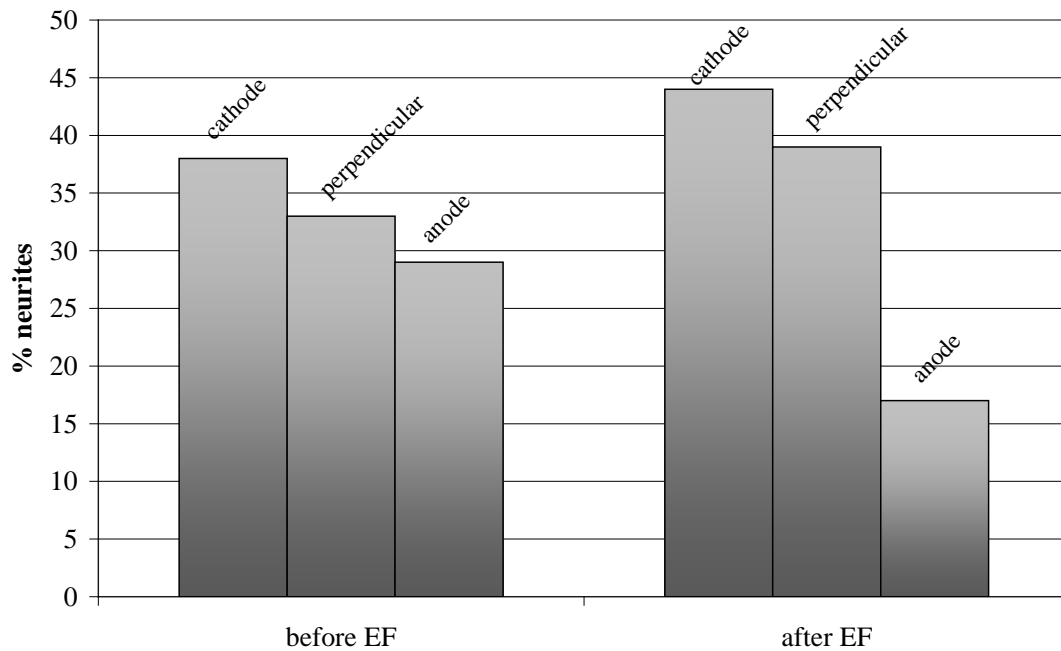


Fig. 7.10 Percentages of neurites direction facing towards the cathode, anode or perpendicular before and after applied EF (150 mV/mm) in *Xenopus* cell cultures over *cover glass*. The percentages of neurites oriented towards the anode before the application of EF decreased after the experiment to increase the percentages of neurites oriented towards the cathode or in a perpendicular direction.

7.4.2 Fluorescence microscope for TiO₂ substrates

Xenopus cell cultures over TiO₂ substrates were tested when an EF is applied and compared with the same cultures over TiO₂ substrate without EF. The EF applied was 150mV/mm, which was the optimized work potential used previously for the cells cultured onto *cover glass*. The assays are three hours long.

Spider diagrams were obtained, in both cases, by superimposing the neuronal cell bodies and tracing the neurite paths. The qualitative results show how most of the cells turned towards the cathode when electric field is applied **Fig 7.11b**. This means that the numerous adhesions or contacts between the cell and the material's surface by the filopodia created by the cells do not avoid the oriented growth of the axon in the expected direction. Moreover, this behaviour has not been observed when the samples are not under EF, **Fig 7.11a**, that the neurites grew without preference direction. On other way, a lower number of neurons are qualitative observed in the cultures grown over TiO₂ when EF is applied, this fact was ascribed to the EF effect, which could change the hydration surface layer of TiO₂ creating a weaker adhesion of the neurons with the material. This parameter will be adjusted in future experiments. In any case, the existence of a directional growth in those cells cultured over TiO₂ indicates that the charge redistribution takes place also in this ceramic dense material showing the topography (**Fig. 3.27, 3.28 y 3.30**) in the micro and nano scale. At the moment, it was not possible to analyze if predominant orientations were also interfered by surface topography, and if grain boundaries or grain cores are predominant surfaces for the adhesion of neurites. In any case, the discussed results are highly promising for a further promotion of oriented growth through biomaterials implanted inside a neural injury.

For quantification of these observations, it was carried out a counting of the growth cones found inside the cathodal and anodal sides of the spider diagrams, percentages were calculated. The results summarized in **Table. 7.2** reveal a wider difference in the percentages of growth cones that grow in opposite sides when EF is applied, founding a 60% of growth cones in the cathodal side. While, this percentage decrease to 53% when there is not EF.

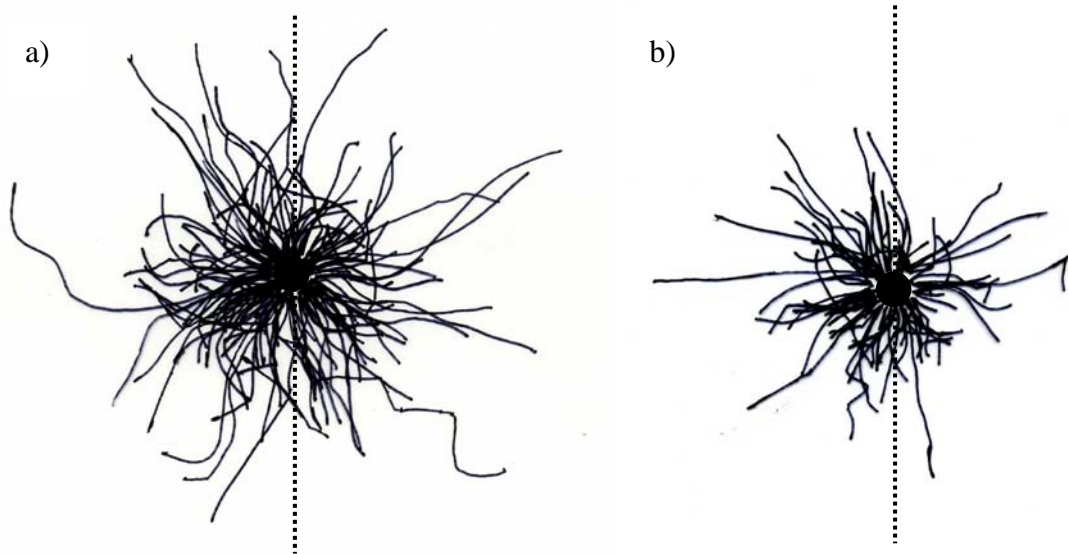


Fig. 7.11 Spider diagrams obtained by superposing the neuronal cell bodies onto a tracing of the neurite paths of *Xenopus* cell cultured over TiO_2 substrates **a)** without EF (on the left) **b)** when a 150mV/mm EF is applied (on the right).

Table 7.2 Summary percentages of growth cones in cathodal and anodal sides of the spider diagrams when EF (150mV/mm) is and is not applied. Assay duration is two hour long.

% growth cones	No EF		EF	
	cathode	anode	cathode	anode
	53	47	60	40

7.5 EFs applied by $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ electrodes

The ability of $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ electrodes to stimulate neural cell cultures applying EFs in DC was evaluated. With this aim, EFs in DC were applied in *Xenopus* cell cultured over *cover glass* through $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ electrodes which were placed directly straight on the culture medium (**Fig. 7.4**). In a first step, the same voltage used previously, 150 mV/mm of EF was applied. This was the EF value optimized to electrostimulate *Xenopus* cell cultured over cover glass using Ag electrodes connected to the culture through Agar bridges.

In the experiments carried out with the Titanium-based electrodes prepared in this work, after 1h of stimulation most cells died, cell membranes suffer a lysis and cell organelles are delivered to the culture medium. Moreover, in the cell plate used next to the electrodes, numerous bubbles were observed. pH was measured finding an acidic pH value next to 5 in the cathode side, and basic pH (≈ 10), in the anode side (Table 8.3). While the pH of the culture medium used in these assays was buffered around 7.8. These observations could be translated in the electrolysis of the watery medium. The electrolysis probably entails a change in the pH which means an unhealthy environment for cells, and could trigger two immediately consequences. First is the denaturation of proteins and nutrients of culture medium [26], and secondly, the lysis of cell membranes and their straight death.

In Chapter I it was stated that some of the problems presented for different materials oriented to electrostimulation in medicine when EFs are applied was the possibility of irreversible electrochemical reactions that take place in the culture medium or electrode surface. One example of irreversible electrochemical reaction is the hydrolysis of water [27]. Trying to avoid hydrolysis and the triggered reactions which are devastating the cell culture, and with the aim of optimizing work conditions, the electrodes were tested at lower EFs.

Electrostimulation in the following assays was carried out at 15 and 20mV/mm. Under these conditions, cells survived during the 3h of experiment, bubbles were not found in the medium around the electrodes and pH changes were not too extreme as when higher EFs were used (**Table 7.3**).

Table 7.3 Summary of pH changes generated around each electrode at different EFs of stimulation. When no EF is applied the pH is around 7.8 (buffered medium).

EFs	cathode	anode
10mV/mm	7	8
15mV/mm	6,5	8,5

In these assays, the mathematical analysis of the results was carried out with the same procedure used in the evaluation of the assay employed as control (*Xenopus* cell cultures over *cover glass* and EFs applied by Ag electrodes through agar bridges at the same potentials). At these working EFs, a preferential angle turned in the growth of axons cells was not detected. It was only found a small orientation -8.9° towards the cathode that appeared under 15mV/mm , when EF was applied through Ag electrodes connected by Agar bridges to the culture medium. Working at this EF, the average of angle turned after 3h of electrostimulation using $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ electrodes cannot be considered significant enough (**Fig. 7.12**). These results are wider exposed in **Fig. 7.13** and **7.14** where can be observed averages of angles turned, with Ag-Agar bridges and Ti_5O_9 respectively, at different collated times.

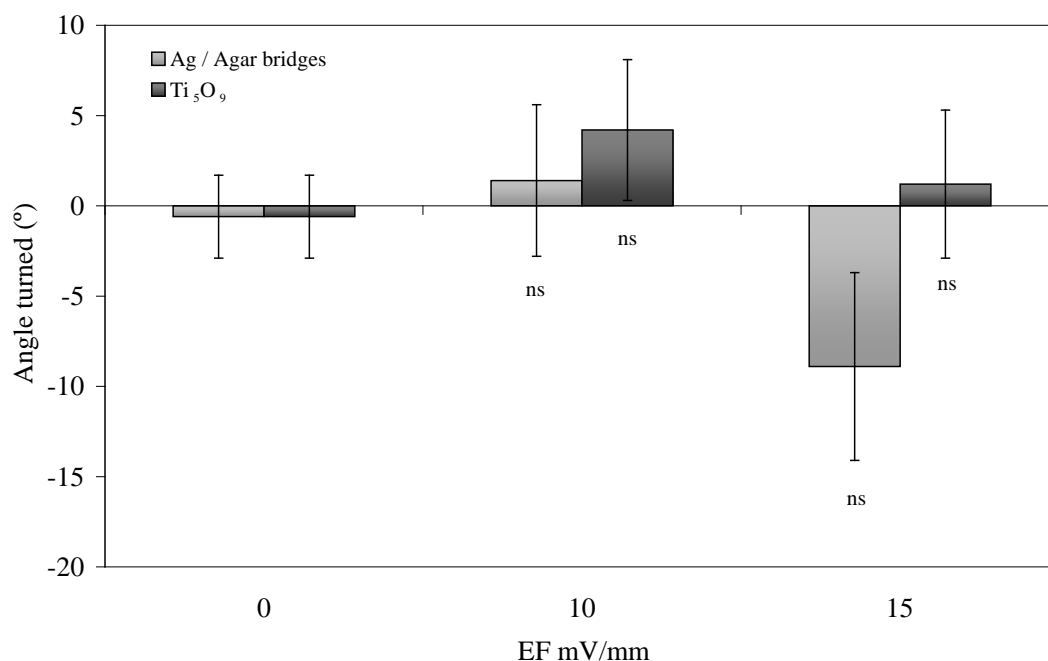


Fig. 7.12 Average of angle turned after 3 hours of electrostimulation when 10 and 15mV/mm are applied by Ag-Agar bridges and $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ electrodes, and compared when no EF is applied as control. No significant (ns) angles turned appeared after the assay.

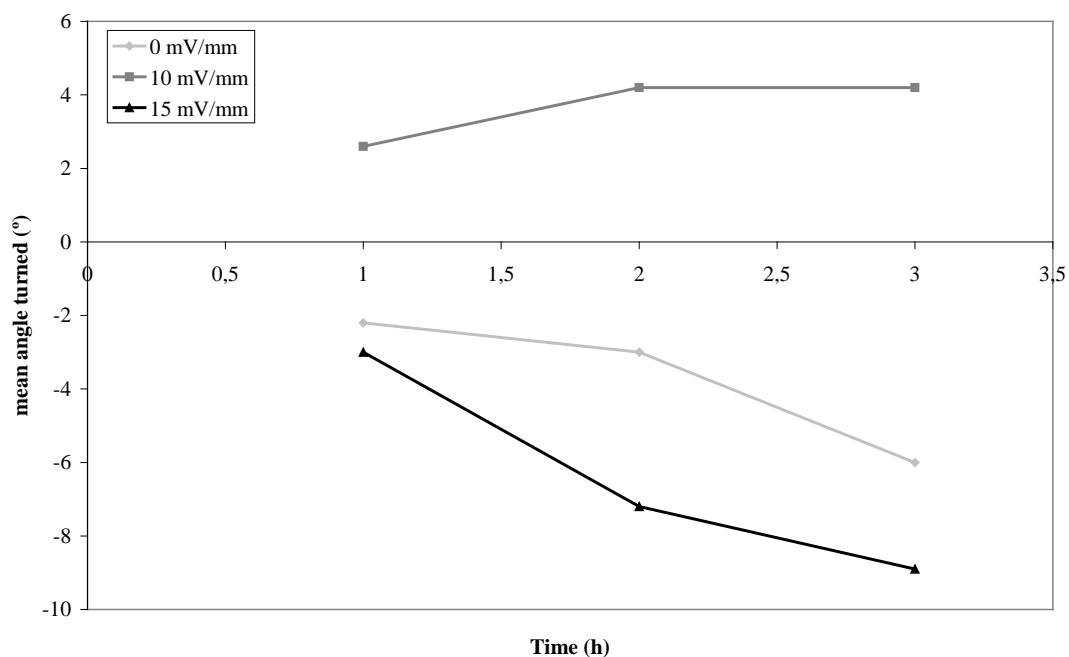


Fig. 7.13 Averaged angle turned at 1, 2 and 3 hours when EF is not applied and when EF is applied at 10mV/mm and 15mV/mm with Ag-Agar bridges electrodes.

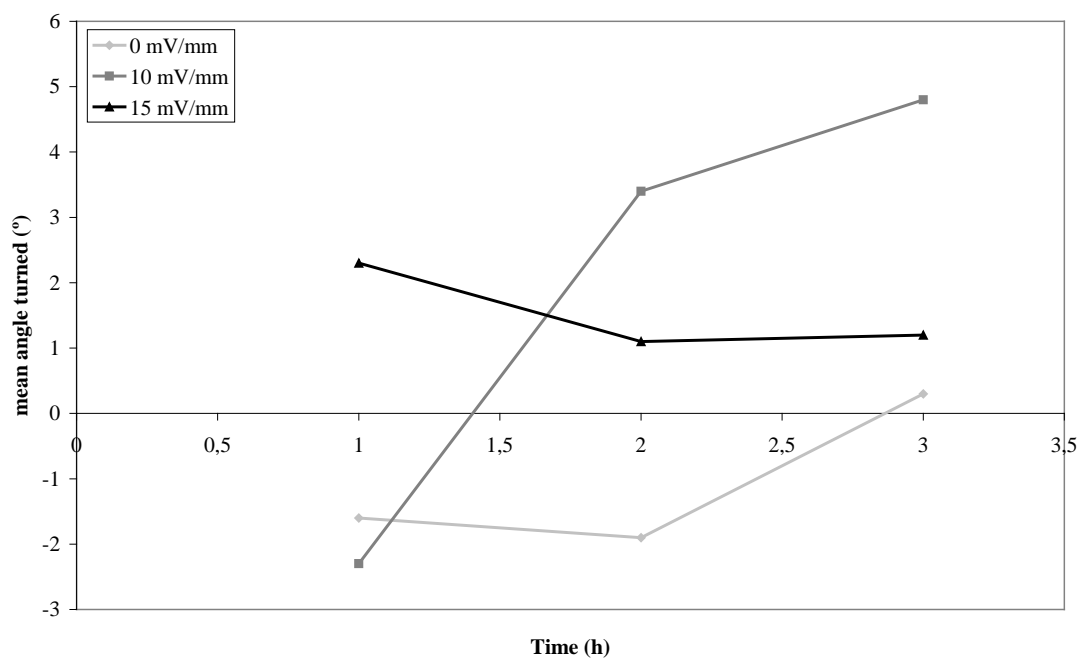


Fig. 7.14 Averaged angle turned at 1, 2 and 3 hours when EF is not applied and when EF is applied at 10mV/mm and 15mV/mm with Ti_5O_9 electrodes.

When EF of 15mV/mm is applied through Ag electrodes, the percentage of growth cones which growth towards the cathode represents a 45% compared with the 27% which growth towards the anode. This difference is narrower in case of the EF (15mV/mm) applied with $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ electrodes. In this case, 36% of growth cones turn on towards the cathode and 33% turn on towards the anode, and anyway differences with the control (when no EF is applied) are no significant (**Fig. 7.15** and **7.16**).

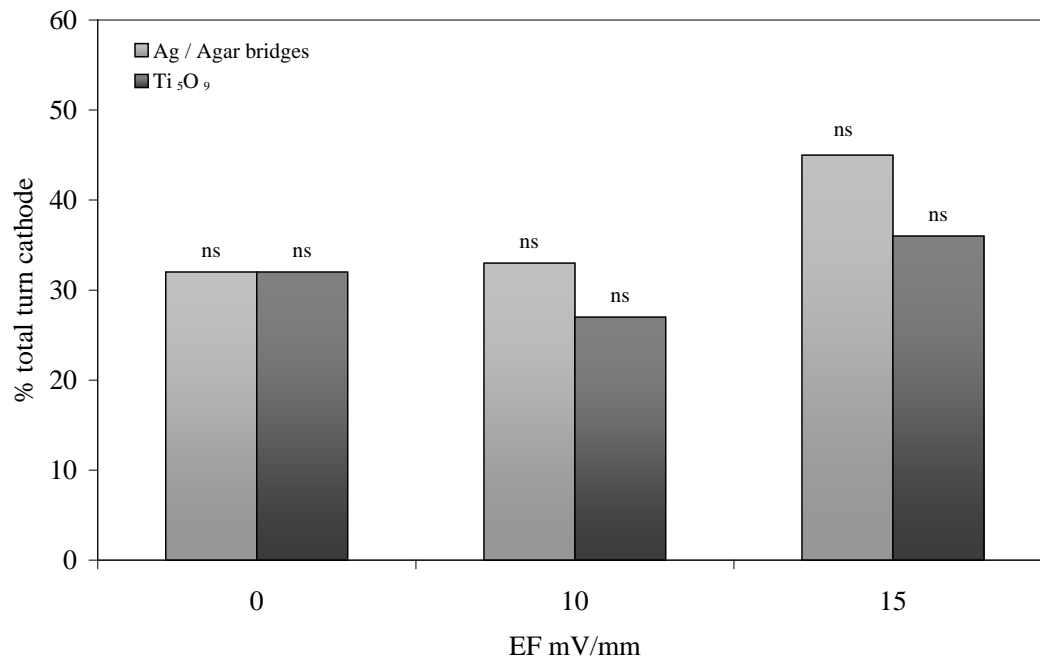


Fig. 7.15 % of growth cones which turned on towards the cathode after 3 hours of electrostimulation when 10 and 15mV/mm are applied by Ag-Agar bridges and $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ electrodes. Results are compared with assays under no EF as control.

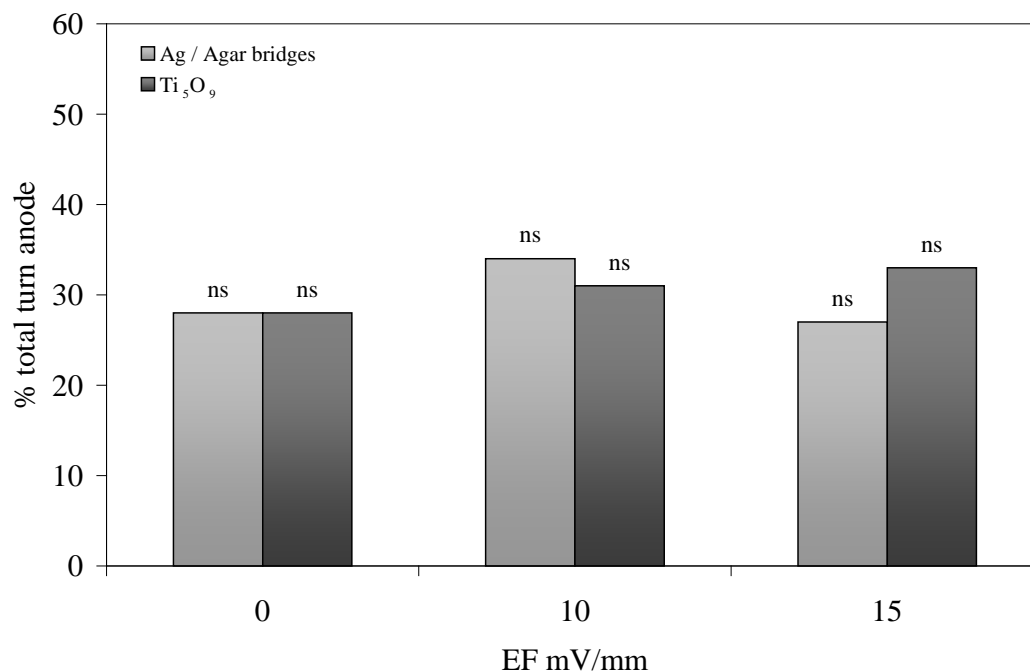


Fig. 7.16 % of growth cones which turned on towards the anode after 3 hours of electrostimulation when 10 and 15mV/mm are applied by Ag-Agar bridges and Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes. Results are compared with assays under no EF as control.

Regarding with the growth rate, not significant differences are found at different work potentials, in general, with the control. However, the tendency between the electrodes (Ag -Agar bridges and Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes) seems suggest a increase in the work rate at 15 mV/mm compared to 15 mV/mm. A light decrease of the growth rate (**Fig 7.17**) is just observed when 10 mV/mm was applied in *Xenopus* cell cultures by Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes, even with Ag electrodes no increase of growth rate is found, compared with the control (EF is 0 mV/mm). Although, no significant differences are detected when 15mV are applied with Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrode compared with cell cultures where no EF is applied, it can be observed a soft increase tendency respect the growth rate when 10 mV/mm is used. Moreover, a smooth increase when 15 mV/mm is applied by Ag-Agar bridges electrodes, but no significant differences are detected when the same electrodes work at 10 mV/mm, compared with the control.

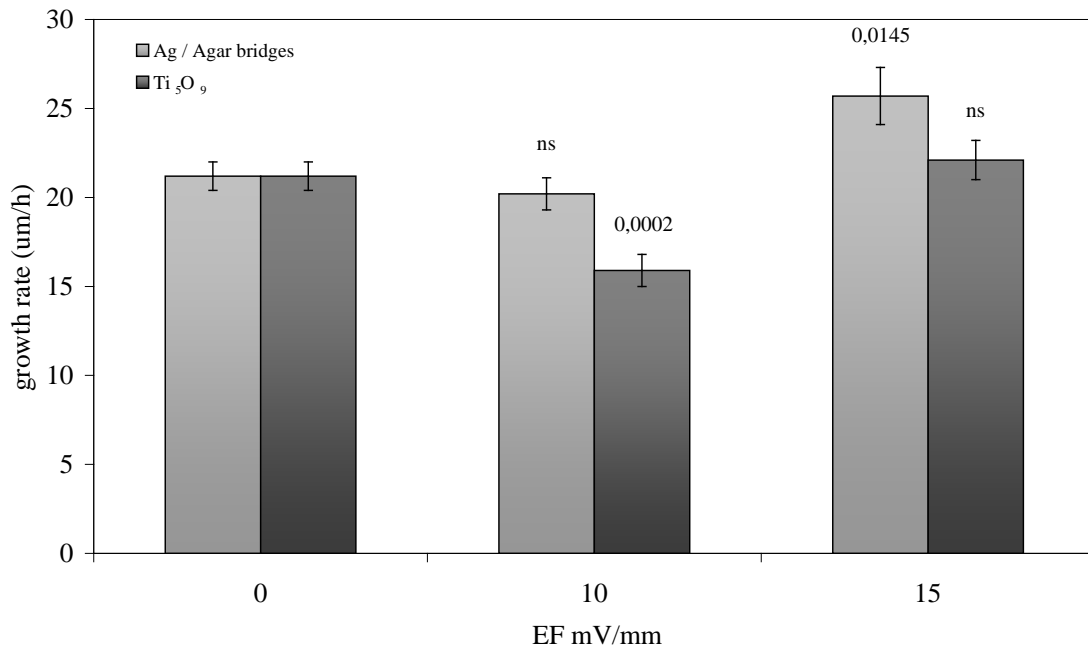


Fig 7.17 Growth rate of the axons after 3 hours of electrostimulation when 10 and 15mV/mm is applied through Ag-Agar bridges and Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes, and compared with the control maintained the same time without EF application.

In **Fig. 7.18** are showed the growth rates of axons which grow on the cathodal or anodal direction, depending of the EFs applied and divided in two groups: Ag-Agar bridges and Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes. This graphic reveals a slight decrease in the growth rate of the axons, in both directions facing, at 10mV/mm of working EF applied with both kinds of electrodes. Have to be marked that the difference with the control is lower in the anode facing when 10mV/mm are applied with Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes. A slightly increase in the growth rate of the axons, in both direction facing, is observed when 15mV/mm of EF is applied with Ag-Agar bridges electrodes. Also, at the same conditions of work, 15 mV/mm of EF applied, applied with Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes, there is an increase in the growth rate of the axons in both direction facing respect the 10mV/mm EF; but compared when EF is not applied there is not increase in the growth rate. And the high growth rate orientation has changed from anode to cathode, when value of EF is modified from 10 to 15 mV/mm. With both kind of electrodes working at 10mV/mm the growth rate seems lower compared with the growth rates when no EF is applied.

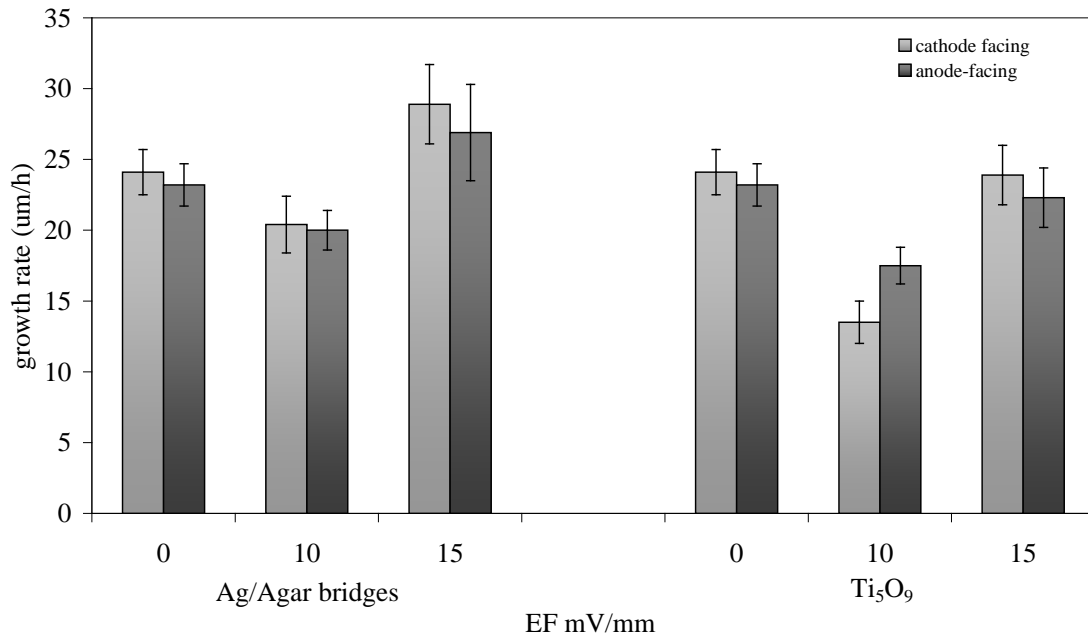


Fig 7.18 Growth rates of axons which grow in the cathodal or anodal direction, depending of the EFs applied and divided in the Ag/Agar bridges and Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes groups.

In summary, **Fig. 7.18** illustrated how 10 mV/mm of EF seems inhibit the growth or, at least, does not promote an increase in the growth rate. Working at 15 mV/mm only is effective, for increase the growth rate, when this EF is applied by Ag-Agar bridges electrodes. There are not significant differences, in the growth rate, when 15mV/mm is applied by Ti₄O₇/Ti₅O₉ electrodes compared with the control (without EF); but promote an increase in the growth rate to both orientations (anode and cathode) respecting the 10 mV/mm EF.

7.6 Conclusions

- ✓ Influence of the substratum in the *Xenopus* neural cells morphology
 - ❖ Different surfaces, characterized for their own chemical and morphological properties, promote changes in the morphology of neural cells.
 - ❖ Cell morphology of neural cell cultures over TiO₂ surface show high number of filopodia in the growth cone, high density of filopodia in the axons and high number of branches. All of them are higher compared with cell cultured over the control substrate (*cover glass*), and these results are translated in a good adhesion cell-surface and higher probability of creating neuron-neuron connections which will end in a final neural network.
- ✓ Field-Induced asymmetry of the direction of neurite growth
 - ❖ When an EF of 150 mV/mm of magnitude is applied in *Xenopus* cell cultured over *cover glass*, axons show a preferential direction associated with the turn of the growth cones promoted by the EF application. 40% of growth cones turned toward the cathode compared with 20% of them that grew towards the anode. The average of angle turned gets a maximum of -16.3° at 2h.
 - ❖ The same EF applied in *Xenopus* cell cultures over TiO₂ show lower number of fillipodia and branches decrease compared with cells growth in the same substrate without EF, maybe due to a change in the interface cell-material promoted by EF application, which decreases the adhesion. However number of fillipodia in the growth cone and number of branches continue being higher than for other substrates. The rough topography and the excellent adhesion cell-material do not generate obstacles for EF turn of the growth cones towards the cathode.

- ✓ EFs applied by Ti_4O_7 electrodes
 - ❖ Working with Ti_4O_7 electrodes whose chemical, electrochemical and morphological properties were showed in the Chapter VI, requires lower EFs magnitudes, as irreversible media reactions are created at 200mV/mm. EFs has been selected between 10 to 15 mV/mm, to avoid those irreversible electrochemical reactions as hydrolysis which is responsible of the change in the pH medium causing the cells lysis.
 - ❖ Working at EFs between 10 and 15 mV/mm cells survive with Ti_4O_7 electrodes, but any signal of stimulation of the growth rate or the growth cones orientation was found.
 - ❖ Have to be marked that Ti_4O_7 electrodes are working straight to the cell culture compared with the control, where Ag electrodes are pooled in a Steinberg solution which connect with de cell medium through Agar bridges. The work conditions for test the Ti_4O_7 electrodes are adding a level of difficulty and they get similar results to the control at the same work conditions.
 - ❖ Finally the surface properties of Ti_4O_7 electrodes have to be improved by ceramic processing with the aim of get work with higher potentials which are able to oriented axon growth.

Bibliography

1. McCaig, C.D., B. Song and A.M. Rajnicek, *Electrical dimensions in cell science*. Journal of Cell Science, 2009. **122**(23): p. 4267-4276.
2. McCaig, C.D., A.M. Rajnicek, B. Song and M. Zhao, *Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential*. Physiological Reviews, 2005. **85**(3): p. 943-978.
3. McCaig, C.D., A.M. Rajnicek, B. Song and M. Zhao, *Has electrical growth cone guidance found its potential?* Trends in Neurosciences, 2002. **25**(7): p. 354-359.
4. Borgens, R.B., E. Roederer and M.J. Cohen, *Enhanced spinal cord regeneration in lamprey by applied electric fields*. Science, 1981. **213**(4508): p. 611-617.
5. Borgens, R.B., L.F. Jaff and M.J. Cohen, *Large and persistent electrical currents enter the transected lamprey spinal cord*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980. **77**(2 II): p. 1209-1213.
6. Borgens, R.B., A.R. Blight and M.E. McGinnis, *Behavioral recovery induced by applied electric fields after spinal cord hemisection in guinea pig*. Science, 1987. **238**(4825): p. 366-369.
7. Borgens, R.B., *Electrically mediated regeneration and guidance of adult mammalian spinal axons into polymeric channels*. Neuroscience, 1999. **91**(1): p. 251-264.
8. Borgens, R.B., J.P. Toombs, G. Breur, W.R. Widmer, D. Waters, A.M. Harbath, P. March and L.G. Adams, *An imposed oscillating electrical field improves the recovery of function in neurologically complete paraplegic dogs*. Journal of Neurotrauma, 1999. **16**(7): p. 639-657.
9. Shapiro, S., R. Borgens, R. Pascuzzi, K. Roos, M. Groff, S. Purvines, R.B. Rodgers, S. Hagy and P. Nelson, *Oscillating field stimulation for complete spinal cord injury in humans: a phase 1 trial*. Journal of neurosurgery. Spine, 2005. **2**(1): p. 3-10.
10. Curtis, A. and m. Dalby, *Chapter 17: Cell response to nanofeatures in biomaterials*. Nombre del Libro. **Part II: Cell response and regenerative medicine**: p. 431-461.
11. Scotchford, C.A., *Chapter 18: Cell response to surface chemistry in biomaterials*. Nombre del Libro. **Part II: Cell response and regenerative medicine**: p. 463-477.
12. Rajnicek, A.M., K.R. Robinson and C.D. McCaig, *The direction of neurite growth in a weak DC electric field depends on the substratum: Contributions of adhesivity and net surface charge*. Developmental Biology, 1998. **203**(2): p. 412-423.
13. Erskine, L., R. Stewart and C.D. McCaig, *Electric field-directed growth and branching of cultured frog nerves: Effects of aminoglycosides and polycations*. Journal of Neurobiology, 1995. **26**(4): p. 523-536.
14. Palmer, A.M., M.A. Messerli and K.R. Robinson, *Neuronal galvanotropism is independent of external Ca^{2+} entry or internal Ca^{2+} gradients*. Journal of Neurobiology, 2000. **45**(1): p. 30-38.
15. Lin, C.H. and P. Forscher, *Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions*. Journal of Cell Biology, 1993. **121**(6): p. 1369-1383.

16. Faber, P.D.N.a.J., *Normal table of Xenopus laevis (Daudin). : A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis.* 1956.
17. Hinkle, L., C.D. McCaig and K.R. Robinson, *The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field.* Journal of Physiology, 1981. **Vol. 314**: p. 121-135.
18. McCaig, C.D., D.W. Allan, L. Erskine, A.M. Rajnicek and R. Stewart, *Growing Nerves in an Electric Field.* Neuroprotocols, 1994. **4**(2): p. 134-141.
19. Collazos-Castro, J.E., A.M. Cruz, M. Carballo-Vila, M. Lira-Cantú, L. Abad, Á.P. del Pino, J. Fraxedas, A. San Juan, C. Fonseca, A.P. Pêgo and N. Casañ-Pastor, *Neural cell growth on TiO₂ anatase nanostructured surfaces.* Thin Solid Films, 2009. **518**(1): p. 160-170.
20. McCaig, C.D., *Nerve branching is induced and oriented by a small applied electric field.* Journal of Cell Science, 1990. **95**(4): p. 605-615.
21. McCaig, C.D., L. Sangster and R. Stewart, *Neurotrophins enhance electric field-directed growth cone guidance and directed nerve branching.* Developmental Dynamics, 2000. **217**(3): p. 299-308.
22. Erskine, L. and C.D. McCaig, *Growth cone neurotransmitter receptor activation modulates electric field-guided nerve growth.* Developmental Biology, 1995. **171**(2): p. 330-339.
23. Stewart, R., L. Erskine and C.D. McCaig, *Calcium channel subtypes and intracellular calcium stores modulate electric field-stimulated and -oriented nerve growth.* Developmental Biology, 1995. **171**(2): p. 340-351.
24. Zhao, M., A. Dick, J.V. Forrester and C.D. McCaig, *Electric field-directed cell motility involves up-regulated expression and asymmetric redistribution of the epidermal growth factor receptors and is enhanced by fibronectin and laminin.* Molecular Biology of the Cell, 1999. **10**(4): p. 1259-1276.
25. Fang, K.S., E. Ionides, G. Oster, R. Nuccitelli and R.R. Isseroff, *Epidermal growth factor receptor relocation and kinase activity are necessary for directional migration of keratinocytes in DC electric fields.* Journal of Cell Science, 1999. **112**(12): p. 1967-1978.
26. Klotz, I.M. and J. Ayers, *Protein interactions with organic molecules.* Discussions of the Faraday Society, 1953. **13**: p. 189-196.
27. Cogan, S.F., *Neural stimulation and recording electrodes.* 2008. p. 275-309.

Capítulo VIII

VIII Summary Conclusions

This doctoral thesis has had as main objective the development of ceramic materials for being used in a future implant which would be employed in repair spinal cord injuries.

With this aim TiO_2 is proposed to satisfy the function of substrate. Two different dimensional substrates are obtained: 2-D (pellets), to study cell cultures, and 3-D, to develop a ceramic process used in the future fabrication of the implant.

- ❖ The method employed to synthesise Titanium oxide powders, , sol-gel method and subsequent precipitation, has shown being a suitable technique to prepare powders with a high specific surface area and with grains with shape and size appropriate to fabricate as the 2-D as the 3-D substrates using formed process different totally. 2-D substrates as dense discs were made first by isostatic press and then sinterization; and 3-D substrates, as Conduits or “tubes” and Scaffolds or “sponges” were produced first by dipping method of templates and then sinterization.
- ❖ After different thermal treatments (P-II, P-III and P-IV, chapter IV) for sinterization, the treatment at $1400^\circ\text{C}/4\text{h}$ (P-I) to sinter 2-D samples was correct choice to prepare the substrates. The neural cells cultures from cerebral cortex of E14 Wistar rat embryos cultured over the substrates obtained by this treatment (P-I) and compared with the control (cover glass) show similar percentage of survival cells, and moreover, cells show similar morphology, according with the number of neurites around the cell bodies. These data confirm the neurons enjoy the morphology and topography, grain sizes $10\text{-}100\ \mu\text{m}$ and the formation of terraces in the order of nm in the next grain border sides for 2-D and 3-D substrata, obtained by this treatment.

On other hand, Magnéli phases (Ti_5O_9 , $\text{Ti}_4\text{O}_7/\text{Ti}_5\text{O}_9$ and Ti_4O_7) and TiN were suggested as electrode materials for electrostimulation.

- ❖ In this work it has been achieved developing the conditions to obtain Magnéli phases from TiO_2 samples (powder, pellets and 3-D substrata) prepared, which consists in a thermal treatment at $1400^\circ\text{C}/12\text{h}$ in N_2/H_2 (90:10) atmosphere, controlling the local Po_2 by means of the quantity of sample introduced in the furnace. The material obtained is a great candidate for as electrode in biomedicine because its properties, such as a high electrical conductivity at 37°C , 10279 S/cm , and its maximum conductivity, 10833 S/cm at 60°C , higher than values exposed in the literature for the same materials (Ti_4O_7 single crystal conductivity 1500 S/cm). Moreover, CV reveals an excellent stability at physiological conditions. Other studies, by CV and EIC, discover that material inject charge through a capacitive mechanism and SCS (77.3 mC/cm^2 in PBS, and 106.7 mC/cm^2 in Neurobasal media) is higher than values showed in the literature for other materials (TiN coatings $250\mu\text{C/cm}^2$ in PBS), which work in similar conditions and inject charge by the same mechanism. .
- ❖ TiN was obtained from TiO_2 samples, powders and dense samples in 2-D, by thermal treatment at $1100^\circ\text{C}/3\text{h}$ in NH_3 atmosphere, is considered an other promising candidate as electrode in biomedicine Because, besides to have an electrical conductivity of 235 S/cm at 37°C and a maximum of conductivity 2917 S/cm at 60°C , the studies realized of this sample by CV and EIC reveal that, in the same way than Magnéli phases, SCS values (13.6 mC/cm^2 in PBS, and 8.4 mC/cm^2 in Neurobasal media) are higher than values showed in the literature for other materials, which work in similar conditions and inject charge by the same mechanism, capacitive mechanism, ($550\mu\text{C/cm}^2$ Pt and 2.8 mC/cm^2 SIROF in PBS)

The biocompatibility of titanium oxide materials was studied by the evaluation of their scavenging activity. They were established two different procedures according with the information in the literature and used for the evaluation: ONOO \cdot radical in aCSF media and DPPH \cdot radical in alcoholic media. The study of different materials with different properties (antase/rutile composition, cristallinity, specific surface area, particle size distribution and oxidation state of Titanium), which are due to the ceramic process apply, contribute to give some clues about the parameters which play an important role in the scavenging mechanism.

- ❖ Materials used in the assays are characterized by: DRX (for study the anatase/rutile composition and cristallinity), by UV-Vis (for study the *Band Gaps*) and by XPS (for study the Ti³⁺/Ti⁴⁺ composition). TiO₂ materials sensitized and processed in this work have a logical behaviour in the relationship of these properties measured. The calcination temperature increases the cristallinity until a critic temperature, where the heating energy is invested in the phase conversion antase to rutile. These changes are linked to a decrease in the *Band Gap* by a synergetic effect, a decrease in the specific surface area and an increase in the particle size distribution.
- ❖ Reduced Titanium oxides with most of Ti as Ti³⁺ have more advantages over the titanium oxide with mainly an oxidation state Ti⁴⁺ respect to the scavenging activity.
- ❖ Between titanium oxides TiO₂, rutile phase seems play an important role. Materials with a percentage of rutile phase higher than 87% and *Band Gap* values lower than 3.1 eV, eliminate a higher concentration of DPPH \cdot radicals than materials with a percentage of rutile lower than 71% and values *Band Gap* higher than 3.1eV. Crystallinity of anatase phase increases the scavenging activity but is not as important as rutile composition.

Proved the scavenger capacity of Magnéli phases obtained in the work, their excellent properties as electrodes and the idea of oxidation state of the material play an important role in the scavenging mechanism, some electrochemical methods were suggested to study the scavenging mechanism.

- ❖ CV and ECN methods reveal that DPPH \cdot is reduced to DPPH $_2$ in the surface of the Magnéli phases materials but do not exist any evidence about changes in the phases in the material surface.
- ❖ Electrochemical Noise (ECN) method, not utilised before in this field, has demonstrated being a good technique to detect the changes in scavenging tests without an input signal being necessary for the measurement.
- ❖ DRX and Band Gap measurements, before and after contact of material and DPPH \cdot media during 21 days, reassert that there are no changes in the material after a long time reaction.

Finally, titanium oxide materials proposed for the implant were tested in electrical stimulation conditions, TiO_2 as substrate and Magnéli phases as electrode.

- ❖ *Xenopus* cell cultures over TiO_2 substrate under electrical stimulation conditions present lower number of cells compared with *Xenopus* cell cultures over TiO_2 substrate when no EF is applied (control). Moreover, there is lower number of filopodia, in the axones and growth cones, and number of branches compared with control. These differences are maybe due to a change in the interface cell-material promoted by EF application. Despite of these decreases, the number of filopodia in the growth cones and the number of branches continue being higher that obtained in other material studied by the same method. Anyway, the topography and the excellent adhesion cell-material do not generate obstacles for EF turn of the growth cones towards the cathode. When EF is applied a 60% of neurites growth towards the cathode compared with the 53% which growth in the same direction when EF is not applied.
- ❖ Magnéli phases electrodes have to work at lower potentials than Ag/AgCl electrodes for do not damage cells cultures over cover glass. At these potential (15mV/mm) axons and direction facing of growth cones do not show the direction orientation preference obtained when Ag/AgCl electrodes work at the same EF. It is important, point out that Magnéli phases were tested straight placed onto the cell culture media, obtaining similar results to Ag/AgCl electrodes working at the same EF but connected by Agar bridges. This means one step further on the development of these materials as electrodes was gotten.

TiO₂ 2-D and 3-D structures, obtained by ceramic processing, from powder synthesised by sol-gel and subsequent precipitation, with a sintered thermal treatment at 1400°C, are promising materials suggested for medical implants oriented to repair spinal cord injury, and probably for repair damage tissue of CNS.

Magnéli phases Ti₄O₇ and Ti₅O₉ obtained from TiO₂ samples by thermal treatment at 1400°C/12h in N₂/H₂ atmosphere, present excellent electrical and electrochemical properties for being used as electrode in medical devices. However, physical surface properties have to be improved by ceramic process in case of be use for electrical stimulation in DC.

Scavenging activity of titanium oxide materials is increased by the increment of anatase crystallinity, rutile phase and Ti³⁺ in the samples. All this properties are linked to a decrease of the Band Gap. And changes at the material were not found after the neutralization radical reaction.
